

Entwicklung eines dreidimensionalen, membranverankerten Chondrozytenimplantats
auf der Basis von Spongostan®

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Anja Beberhold
geboren am 23.01.1982 in Dresden

Gutachter

1.
2.
3.

Tag der öffentlichen Verteidigung:

I. Abkürzungen

ACT	Autologe Chondrozytentransplantation
a.d.	Destilliertes Wasser
cDNA	complementary DNA
Col I	Kollagen Typ I
Col II	Kollagen Typ II
DMB	1,9 - Dimethylenblau
DMEM	Dulbecco's modified Eagles medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
GAG	Glykosaminoglykan
GAPDH	Glyzerinaldehydphosphat – Dehydrogenase
HE	Hämatoxylin - Eosin
mRNA	Messenger - RNA
MWCO	Molecular weight cut off
OCT	Osteochondrale Transplantation
OD	Osteochondrosis dissecans
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transkriptase PCR
RNA	Ribonukleinsäure
SQ	Starting Quantity (Anzahl der mRNA-Kopien zu Beginn der qRT-PCR)

Verwendete Einheiten

g	Gramm
l	Liter
min	Minuten
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunden

Präfixe

m	milli
μ	mikro
n	nano

II. Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis.....	i
II.	Inhaltsverzeichnis.....	ii
1.	<i>Zusammenfassung</i>	1
2.	<i>Einleitung</i>	3
2.1	Der Knorpel.....	3
2.1.1	Struktureller Aufbau.....	3
2.1.2	Bestandteile des Knorpels.....	4
2.1.2.1	Chondrozyten.....	4
2.1.2.2	Die extrazelluläre Matrix.....	5
2.2	Knorpelschäden.....	6
2.3	Therapie des Gelenkknorpelschadens.....	9
2.3.1	Lavage und Débridement.....	9
2.3.2	Refixation.....	9
2.3.3	Knochenmarkstimulierende Operationen.....	9
2.3.4	Osteochondrale Transplantate.....	10
2.3.5	Die autologe Chondrozytentransplantation.....	11
2.4	Biomaterialien für die Knorpelzelltransplantation.....	13
2.4.1	Kollagen basierte Träger.....	13
2.4.2	Alginat.....	14
2.4.3	Fibrin.....	15
2.4.4	PLA-/PGA-Polymere.....	15
2.4.5	Andere synthetische Materialien.....	16
2.5	Entwicklung eines trägergebunden Chondrozytenimplantats.....	17
2.5.1	Spongostan®.....	17
2.5.2	Kultivationssystem.....	18
3.	<i>Fragestellungen der Arbeit</i>	19
4.	<i>Material</i>	20
4.1	Geräte.....	20
4.2	Verbrauchsmaterialien.....	20

4.3	Chemikalien.....	21
4.4	Testkits.....	21
4.5	Puffer, Lösungen und Kulturmedien für die Zellkultur.....	21
4.6	Ansätze für den DMB-Assay.....	22
4.7	Antikörper.....	22
4.8	Computersoftware.....	23
5.	<i>Methoden</i>	24
5.1	Versuchsablauf.....	24
5.1.1	Knorpelpräparation.....	24
5.1.2	Verdau des Knorpels.....	25
5.1.3	Herstellung der Spongostan®-Chondrozyten-Masse.....	26
5.1.4	Herstellung der Kultivationskammer.....	27
5.2	Histologische Methoden.....	29
5.2.1	Herstellung von Kryostat-Schnitten.....	29
5.2.2	Histologische Färbemethoden.....	29
5.2.2.1	Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE-Färbung).....	29
5.2.2.2	Färbungen mit 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI).....	30
5.2.2.3	Färbung mit Propidiumiodid.....	30
5.2.3	Immunhistologie.....	31
5.2.3.1	Kollagen Typ II.....	31
5.2.3.2	Pro-Kollagen Typ I.....	31
5.2.3.3	Aggrekan.....	31
5.3	Biochemische Charakterisierung der Zellkulturen.....	32
5.3.1	Papain-Verdau.....	32
5.3.2	DMB-Assay.....	32
5.4	Molekularbiologische Methoden.....	33
5.4.1	Isolierung der RNA.....	33
5.4.2	Reverse Transkriptase.....	34
5.4.3	Quantitative real-time Polymerasekettenreaktion.....	34
5.4.4	Auswertung der qRT-PCR.....	37
5.5	Statistische Methode.....	37

6.	<i>Ergebnisse</i>	38
6.1	Vorversuch: Monolayerkultur.....	38
6.1.1	mRNA-Expression.....	38
6.2	Die Kulturkammern.....	40
6.2.1	Allgemeine Betrachtungen.....	40
6.2.2	Kultivierung der Kammern für sieben Tage.....	41
6.2.2.1	Histologie.....	41
6.2.2.2	mRNA-Expression.....	43
6.2.3	Kultivierung der Kammern für 14 Tage.....	44
6.2.3.1	Histologie.....	44
6.2.3.2	mRNA-Expression.....	46
6.2.4	Kultivierung der Kammern für 28 Tage.....	48
6.2.4.1	Histologie.....	48
6.2.4.2	mRNA-Expression.....	49
6.3	Biochemische Charakterisierung.....	51
7.	<i>Diskussion</i>	52
8.	<i>Schlussfolgerungen</i>	58
9.	<i>Literaturverzeichnis</i>	60
	Anhang.....	70

1. Zusammenfassung

Das eingeschränkte Heilungsvermögen des hyalinen Gelenkknorpels ist seit langem bekannt. Die konventionelle autologe Chondrozytentransplantation, die von Brittberg und Mitarbeitern (1994) vorgestellt wurde, hat sich in den vergangenen Jahren als häufig genutztes Verfahren bei der Behandlung chondraler und osteochondraler Defekte etabliert. Die Verwendung von Trägermaterialien, die die chondrogene Differenzierung der eingebrachten Zellen unterstützen und sie vor mechanischer Alteration schützen, ist bei der Therapie von Gelenkknorpeldefekten ein verfolgenswerter Ansatz.

In dieser Arbeit wurde das Hämostyptikum Spongostan®-Pulver erstmalig zur Herstellung eines membranverankerten, dreidimensionalen Chondrozytenimplantats benutzt.

Um den Einfluss des aus gereinigter porciner Gelatine bestehenden Pulvers auf die Vitalität und Differenzierung boviner artikulärer Chondrozyten zu untersuchen, wurden identische Monolayerkulturen für 14 Tage kultiviert. Das Medium wurde mit 0,3 mg/ml Spongostan® versetzt, während das Medium von Kontrollkulturen unverändert blieb. Mit der quantitativen Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) wurden die mRNA-Expression des chondrogenen Differenzierungsmerkmals Kollagen Typ II und des Dedifferenzierungsmerkmals Kollagen Typ I untersucht.

Zur Herstellung der Chondrozytenimplantate wurden primäre, bovine Chondrozyten in Spongostan® Pulver eingebracht. Die nun formbare Masse wurde anschließend zwischen einer Kollagenmembran und einem Dialyseschlauch in Kulturkammern für sieben, 14 und 28 Tage kultiviert. Es folgte die immunhistologische Darstellung chondrogener Differenzierungs- (Typ-II-Kollagen und Aggrecan) und Dedifferenzierungsmerkmale (Pro-Kollagen Typ I). Die Ermittlung der mRNA-Expression der Kollagen Typen I und II sowie des Aggrecans erfolgte quantitativ mit Standard gekoppelter qRT-PCR. Die Menge der in den Kulturkammern produzierten Glykosaminoglykane wurde photometrisch mit dem Dimethylenblau-Assay bestimmt.

Zwar proliferierten die Chondrozyten in der Spongostan haltigen Medium langsamer, zeigten jedoch gegenüber der Kontrollkultur eine zweifach höhere Typ-II-Kollagen- und eine 280-fach geringere Kollagen-Typ-I-mRNA-Expression.

Die in den Minusheets kultivierte Chondrozyten-Spongostan®-Masse war bereits nach siebentägiger Kultur fest an der Kollagenmembran adhärent. Immunhistologisch waren in der

Matrix zu allen Kultivationszeitpunkten Typ-II-Kollagen, Aggrekan und Pro-Kollagen Typ I darstellbar. In Abhängigkeit von der Kulturzeit zeichneten sich jedoch Unterschiede bei Verteilung und Intensität der Expression der Extrazellulärmatrix ab. Das wichtigste Kollagen des hyalinen Knorpels - Typ II - war nach der ersten und zweiten Woche ubiquitär perizellulär nachweisbar. Nach weiteren zwei Wochen jedoch waren Intensität und Verteilung der Färbung im Präparat deutlich rückläufig. Die Expression des Proteoglykans Aggrekan stieg in den ersten 14 Tagen sukzessive an und fiel auf ein Minimum nach 28 Tagen ab. Pro-Kollagen Typ I offenbarte eine teilweise diffuse, teilweise perizelluläre Expression nach sieben Tagen, die sich nach einer weiteren Woche reduziert zeigte, um nach 28 Tagen sehr intensiv entlang der Hohlraumstrukturen des Spongostan® nachweisbar zu werden.

Die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen spiegelten die der Immunhistologie wider: Die mRNA-Expression von Typ-II-Kollagen nahm in den ersten beiden Kultivationswochen zu und fiel nach weiteren 14 Tagen unter das Niveau der als Kontrolle dienenden Monolayerkultur boviner Chondrozyten ab. Die mRNA-Expression von Aggrekan zeigte den gleichen Verlauf. Das Dedifferenzierungsmerkmal Kollagen Typ I war während der gesamten Kulturdauer induziert, die mRNA-Expression wuchs stetig an, blieb jedoch unter dem Niveau der Kontrolle.

Der Glykosaminoglykangehalt in den Kulturkammern erreichte nach 14-tägiger Kultivierung ein Maximum von 0,21µg/mg Kulturmasse. Die Konzentrationen nach sieben und 28 Tagen lagen mit 0,07µg/mg bzw. 0,06µg/ml deutlich unter dem Höchstwert.

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, auf der Basis des Hämostyptikums Spongostan® ein neuartiges membranverankertes Chondrozytenimplantat zu entwickeln. In diesem ist der Phänotyp der Chondrozyten so stabil, dass eine de-novo Synthese von Kollagen Typ II und Aggrekan stattfindet.

2. Einleitung

2.1 Der Knorpel

Der hyaline Knorpel ist einer der wichtigsten Bestandteile eines jeden echten Gelenkes: Er überträgt und verteilt Druck- und Scherkräfte auf den Gelenk bildenden Knochen, schützt diesen vor Abrieb und ähnlichen mechanischen Schädigungen, gleicht kleinere Unebenheiten desselben aus, um damit die Kongruenz der Gelenkflächen zu verbessern (Poole 1993). Im Zusammenspiel mit der Synovialflüssigkeit erreicht der hyaline Gelenkknorpel einen um das 30-fache geringeren Reibungskoeffizienten als das beste künstliche Gelenk (Niethard und Pfeil 1997).

Die Besonderheit des adulten Gelenkknorpels ist das Fehlen von Nerven, Blut- und Lymphgefäßen. Seine Ernährung erfolgt im Kindesalter durch die Diffusion von Nährstoffen aus dem Epiphysenkörper. Verknöchert dieser zunehmend, ist der bradytrophe Knorpel auf die Ernährung durch die Synovia angewiesen. Das stete Wechselspiel von Knorpelbe- und -entlastung setzt einen gerichteten Nährstoffstrom innerhalb des Gewebes in Gang (Rössler und Rütter 2005).

Die große Druckelastizität des Gelenkknorpels - er vermag die größten Druckbelastungen des Körpers zu kompensieren - wird durch die Komposition und das Zusammenspiel der einzelnen Bestandteile realisiert.

2.1.1 Struktureller Aufbau

Zone I:

Die nur wenige µm messende Tangential- oder Superficialzone dient als Basallamina-Äquivalent. In ihr befinden sich flache Chondrozyten. Die in relativ geringer Anzahl vor-

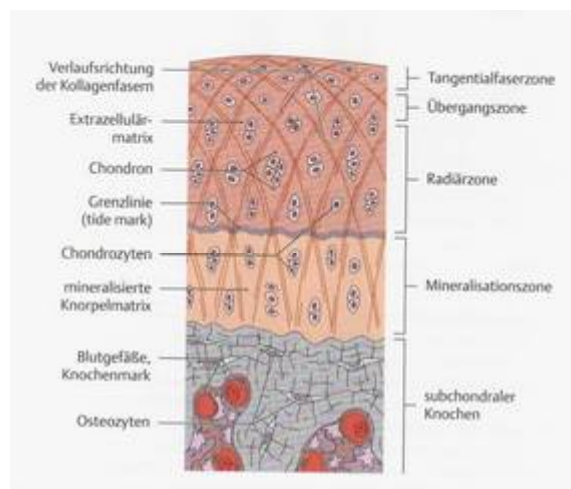


Abb. 1
Zonale Gliederung des hyalinen Knorpels.
Aus (Schünke et al. 2004)

handenen Mitochondrien weisen auf eine geringe Stoffwechselaktivität hin. Trotzdem besitzen sie die Fähigkeit auf äußere Reize, wie etwa Interleukin-1, mit der Synthese von Sauerstoffradikalen und Eicosanoiden zu reagieren. In dieser Funktion ähneln sie Makrophagen (Häuselmann et al. 1994). Die Kollagenfasern in dieser Zone liegen dicht gepackt parallel zur Oberfläche. Zwischen ihnen lagern wenige Proteoglykane.

Zone II:

In der Übergangszone ändern die Kollagenfasern ihre Verlaufsrichtung, überkreuzen einander. Die reich vorhandenen Intrazellulärorganellen der ovalen Chondrozyten deuten eine gesteigerte Stoffwechselaktivität an. Die Zellen sind von einem Halo extrazellulärer Matrix umgeben und bilden kleine Chondrone (isogene Gruppen von Chondrozyten, die durch Mitose entstanden sind).

Zone III:

Die Radiärzone imponiert durch die säulenförmige Anordnung großer, sphärischer Chondrozyten, deren hohe Stoffwechselaktivität durch das gehäufte Auftreten isogener Gruppen zusätzlich hervorgehoben wird. Gemeinsam mit den Zellen der Übergangszone produzieren sie den Hauptanteil der senkrecht zur Oberfläche verlaufenden Kollagen-Typ-II-Fasern und Proteoglykane. Zusätzlich findet hier auch die Synthese Knorpel abbauender Enzyme - vornehmlich Metalloproteinasen - statt (Kuettner 1992).

Zone IV:

In dieser, der so genannten Mineralisationszone, liegen die kleinen Chondrozyten in geringer Dichte zwischen kalzifizierten Kollagenfasern (Mollenhauer und Kuettner 1997). Diese enden abrupt am subchondralen Knochen und bilden die feste osteochondrale Verzahnung. Die zellfreie, etwa 10µm messende Tidemark (Grenzzone) trennt die Radiär- von der Mineralisationszone. Ihre eigentliche Bestimmung ist noch immer unklar. Oegema und Thompson (1986) nehmen eine „Ausguss- und Sammelbeckenfunktion“ für Stoffwechselendprodukte an, da diese Grenzzone mit zunehmendem Knorpelalter in Richtung der Oberfläche wandert.

2.1.2 Bestandteile des Knorpels

2.1.2.1 Chondrozyten

Chondrozyten sind hochdifferenzierte Zellen mesenchymaler Herkunft, die nur einen Anteil von etwa 2% am Gesamtknorpelgewebe haben (Maroudas et al. 1986). Bevorzugt liegen die Zellen einzeln oder aber in kleinen, durch Mitose entstandenen „isogenen“ oder „klonalen“ Gruppen, den Chondronen. Eingebettet in Intrazellulärmatrix, die einen Zell-Zell-Kontakt unterbindet, befinden sich die Chondrozyten in einem eigenen „Mikrokosmos“ (Mollenhauer und Kuettner 1997). Buckwalter und Mitarbeiter (1993) beobachteten kurze, in die extrazelluläre Matrix hineinragende Zilien an den Chondrozyten, die als Sensoren für Änderungen der Umgebung dienen (Buckwalter et al. 1993).

Die Hauptaufgabe der Zellen besteht in der Synthese und Homöostase der Knorpelgrund-

substanz. In gewissen Grenzen besteht die Möglichkeit, die Stoffwechsel- und damit Syntheseleistung an die momentane Belastung des Knorpels anzupassen (Buckwalter und Mankin 1998).

2.1.2.2 Die Extrazelluläre Matrix (ECM)

Zwei Komponenten dominieren quantitativ die extrazelluläre Matrix: das knorpelspezifische Typ-II-Kollagen und das große Proteoglykan Aggrekan. Zusammen stellen sie fast 90% der Gewebe-Trockenmasse.

Kollagene

Im hyalinen Knorpel werden etwa 90% der Kollagene durch das Typ-II-Kollagen repräsentiert. In Zellnähe bildet es durch einen konzentrischen Verlauf einen fibrillären Korb um die Chondrozyten, und schützt sie somit vor direkt einwirkenden Kräften während der Knorpelbelastung (Buckwalter et al. 1993).

In geringeren Mengen finden sich im hyalinen Knorpel auch Kollagene des Typs VI und IX. Ersteres tritt gehäuft in Zellnähe auf, so dass man ihm die Verankerungsfunktion zwischen Zelle und Matrix zuordnet. Typ-IX-Kollagen hingegen schafft eine Verbindung zwischen den Proteoglykanen und Kollagenfasern des Typs II (Mollenhauer und Kuettner 1997).

Proteoglykane

Aggrekan dominiert die Proteoglykane mengenmäßig. Es besteht aus einem langen Kernprotein (Core-Protein), an welches flaschenbürstenartig Glykosaminoglykane (Chondroitin-4-sulfat, Keratansulfat, Hyaluronsäure) kovalent gebunden sind (Abb. 2). Diesen wird durch Sulfat- und Carboxylgruppen eine hohe Wasserbindungskapazität zuteil. Durch die feste Einbindung der Proteoglykane in das Kollagen Netzwerk (Abb. 3) wird die Hydratisierung im Ruhezustand bei etwa 40% gehalten und damit eine übermäßige Quellung des Knorpels vermieden. Dieser Mechanismus gewährleistet durch eine physiologische Vorspannung die Druckfestigkeit des Knorpelgewebe (Maroudas 1986).

Die physiologische Degeneration der Proteoglykane im zunehmenden Lebensalter reduziert die Wasserbindungskapazität, so dass Quelldruck und Belastbarkeit des Knorpels sinken (Rosenberg und Buckwalter 1986).

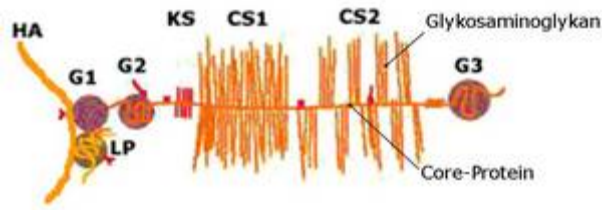


Abb. 2
Schematische Darstellung des großen Aggrecanmoleküls. Aus <http://www.cmb.lu.se/ctb/html/Aggrecan.htm>

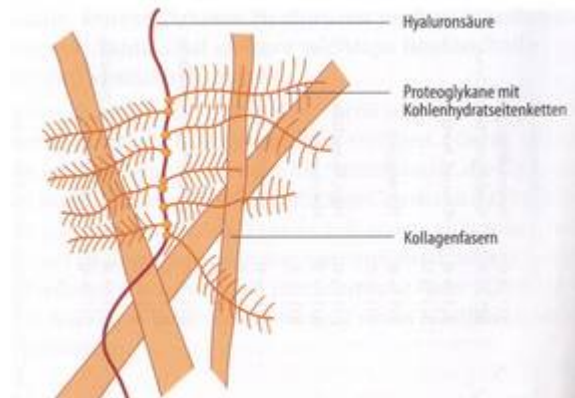


Abb. 3
Kollagenfasern und Proteoglykane als Strukturelemente beim Aufbau der Extrazellulärmatrix. Aus (Löffler 2005)

2.2 Knorpelschäden

„If we consult the standard chirurgical writers from Hippocrates down to the present age, we shall find that an ulcerated cartilage is allowed to be a very troublesome disease and that, once destroyed, is not repaired.“ W. Hunter, 1743

Seit langem ist das eingeschränkte Heilungsvermögen des hyalinen Gelenkknorpels bekannt, und liegt im Wesentlichen in dem mangelnden Zugang zu gewebsspezifischen regenerativen Zellpopulationen begründet. Oberflächliche Schädigungen des Knorpels, die den subchondralen Knochen nicht perforieren, heilen in der Regel nicht. Bei Mitbeteiligung des Knochens kann es durch die Einwanderung mesenchymaler Stammzellen in den Defekt zur Entstehung eines Ersatzfasergewebes kommen. Dieser Regeneratknorpel zeigt eine geringere Belastbarkeit als das ursprüngliche Gewebe (Hunziker 2003), und ist nach wenigen Jahren wegen seiner deutlich schlechteren mechanischen Eigenschaften wieder zerstört (Wirth und Rudert 1996).

Das Heilungsvermögen des Knorpels zeigt eine Altersabhängigkeit: So regeneriert ein jugendlicher Knorpel bei bestehender Ernährung aus der noch nicht verknöcherten Epiphyse eher als der adulte, lediglich durch die Synovia versorgte (Buckwalter 2002). Gelber und Mitarbeiter (2000) schreiben jugendlichen Patienten mit einem Kniebinnenschaden ein um das 2,95-fache erhöhtes Arthroserisiko zu. Sind Erwachsene betroffen, steigt deren Risiko, später an einer Arthrose zu leiden um das 5,17-fache.

Knorpelschäden können aus den unterschiedlichsten Gründen entstehen: Als Ursache isolierter Knorpelschäden kommen singuläre unfallbedingte Geschehen in Frage, etwa im Sinne eines direkten Anpralltraumas oder aber einer Distorsion mit Schermechanismus. Nach isolierten traumatischen Knorpelschäden bei jungen Sportlern ohne adäquate Therapie berichten Messner und Maletius (1996) nach 14 Jahren bei 40% der Nachuntersuchten erste Zeichen einer frühzeitigen Arthrose.

Des Weiteren können rezidivierende Mikrotraumata bei chronischer Überbelastung den Gelenkknorpel verletzen (Dekel und Weissman 1978): So beschreiben Jennings und Mitarbeiter (2001) die Induktion sekundär-destruktiver Prozesse bei Abweichungen von der physiologischen Druckverteilung oder bei metabolischen Störungen.

Wegen ihrer ohne konsequent durchgeführte Therapie schlechten Prognose ist die Osteochondrosis dissecans (OD) von besonderem klinischem Interesse. Prakash und Learmonth (2002) berichten bei Nichtbehandlung einer OD bei Patienten mit verknöcherten Epiphysenfugen in der überwiegenden Zahl der nachuntersuchten Fälle von einer frühzeitigen Arthrose. Die Ätiologie dieser seltenen, vor allem bei männlichen Jugendlichen auftretenden Erkrankung ist weitestgehend unklar. Es werden konstitutionell-prädestinierende Faktoren einerseits, wie auch repetitiv-mikrotraumatisierende Faktoren andererseits diskutiert (Rössler und Rütther 2005). Die OD verläuft typischerweise in Phasen: Im *Initialstadium* entwickelt sich unter der Gelenkoberfläche eine umschriebene Nekrose des Knochens, welche anschließend sklerosieren kann (*Stadium II*). Im *Stadium III* zeigt sich ein „Tod in situ“: Die Nekrosezone hat sich gegenüber ihrer gesunden Umgebung vollständig demarkiert. Reißt der Gelenkknorpel wegen der bestehenden mechanischen Instabilität des subchondralen Knochens schließlich ein, löst sich das Knorpel-Knochen-Stück vom Defektgrund (*Stadium IV, Dissektion*). Es besteht nun eine „Gelenkmaus“ (*Corpus liberum*), die ihr „Mausbett“ verlassen hat und bei bestimmten Bewegungen zu einer vorübergehenden Gelenksperre führen kann (Abb. 4, 5, 6).

Die Prognose von Knorpelläsionen wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Liegt ein Defekt in der Hauptbelastungszone eines Gelenkes, wird er einer größeren mechanischen Beanspruchung und damit eher einer Progredienz unterliegen als eine Läsion, die in selten belasteten Regionen eines Gelenkes entstanden ist. Abb. 7 demonstriert die Wichtigkeit einer stabilen Knorpelschulter um den Defekt: Bei nicht erhaltener Knorpelschulter kommt es zu einer „uncontained lesion“ und damit zur Reizung des subchondralen Knochens (Erggelet und Steinwachs 1998).



Abb. 4
Osteochondrosis dissecans im Stadium III am medialen Femurkondylus. Aus (Strobel et al. 1995)



Abb. 5
Die seitliche Aufnahme bestätigt das Knorpel-Knochen-Stück, welches das Mausebett noch nicht verlassen hat. Aus (Strobel et al. 1995)

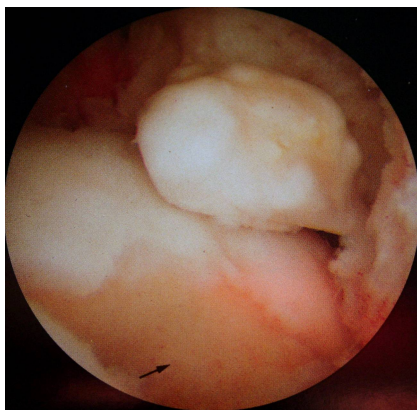


Abb. 6
Arthroskopische Sicherung eines großen Corpus liberum bei alter OD. Der Pfeil kennzeichnet das Mausebett. Aus (Strobel et al. 1995)

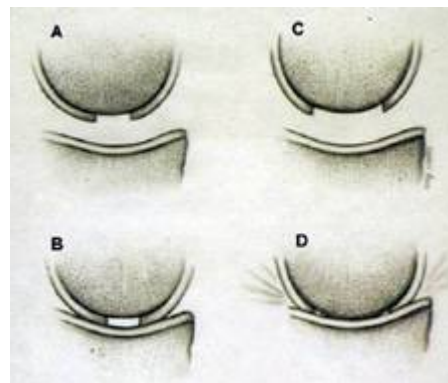


Abb. 7
Bild der „contained lesion“ bei erhaltener Defektschulter (A,B). C, D zeigt die „uncontained lesion“ mit Reizung des subchondralen Knochens. Aus (Erggelet und Steinwachs 1998)

Mögen die Ursachen eines Knorpelschadens noch so vielfältig sein, das geschädigte Gewebe zeigt den gleichen Mechanismus zur Regeneration: Pathologisch aktivierte Chondrozyten produzieren Proteasen, die das Kollagen Netzwerk zerstören. Die Steigerung der Stoffwechselaktivität führt zur Synthese qualitativ insuffizienter Matrixmoleküle mit zunehmender Kalzifizierung des Knorpels (Aigner et al. 1993) bis hin zur Vergrößerung der Tidemark (Mohr 1998). Durch zunehmende mitotische Aktivität zeigen sich im histologischen Präparat Zellnester (Cluster) (Aigner et al. 1992, 1993).

2.3 Therapie des Gelenkknorpelschadens

2.3.1 Lavage und Débridement

Der deutliche Rückgang der Symptomatik, den Patienten nach einer Gelenkspülung verspüren, beruht im Wesentlichen auf der Auswaschung von Entzündungsmediatoren, die eine Synovialitis unterhalten. Ähnliches gilt für das Shaven des Knorpels. Hierbei werden Kollagenfasern, Knorpelfragmente und Aggregate aus degenerierten Proteoglykanen beseitigt, die phlogistische Wirkungen haben (Erggelet und Steinwachs 1998). Weise (2004) hingegen rechnet der Lavage bei traumatischen Knorpelschäden oder der OD einen begrenzten therapeutischen Wert zu.

2.3.2 Refixation

Eine Wiederanheftung vitaler, nicht beschädigter osteochondraler Flakes ist in Abhängigkeit von Größe und Dicke des Fragmentes indiziert (Abb. 8). Vor allem bei jungen Patienten und einem kurzen Intervall zwischen Trauma und Operation sind die Heilungschancen groß. Bei stattgehabter OD sollte der Dissekatgrund von sorgfältig von Fasergewebe befreit werden. Um eine Durchblutung nach der Fixation zu erreichen, sollte der subchondrale Knochen mehrmals angebohrt werden (Weise 2004).

Sekundär können jedoch durch überstehende Implantate wiederum fatale Knorpelschäden entstehen (Weise 2004).

2.3.3 Knochenmarkstimulierende Operationen

Knochenmarkstimulierende Behandlungsmethoden haben das Ziel, den Markraum des subchondralen Knochens zu eröffnen, und eine Blutung aus ihm zu provozieren. Mesenchymale Stammzellen und Fibroblasten sprossen in das Blutgerinnsel ein und bilden in vielen Fällen Ersatzknorpelgewebe (Shapiro et al. 1993).

Bereits 1959 beschrieb Pridie (1959) seine Idee, durch das Anbohren des subchondralen Knochens spontane Reparationsmechanismen zu stimulieren. Jerosch und Mitarbeiter präsentierten in einer deutschlandweit durchgeführten Studie, dass die Pridie-Bohrung bei einer OD die am häufigsten angewandte Therapiemethode ist (1996). Jedoch erreicht diese Methode nur einen kurz anhaltenden Benefit, der einige Jahre nach der Operation nicht mehr nachweisbar ist (Schmidt und Hasse 1989). Darüber hinaus besteht bei der Verwendung von Kirschner-Drähten die Gefahr, den Knorpel thermisch zu schädigen.

Eine technische Modifikation der Pridie-Bohrung stellt die von Steadman und Mitarbeitern (1999) erarbeitete Mikrofrakturierung dar. Mit einem speziellen Meißel wird die subchondrale Knochenlamelle präzise perforiert (Abb. 9). Sledge (2001) berichtet gute Ergebnisse der Mikrofrakturierung bei jungen, sportlichen Patienten.

Bei der Abrasionsarthroplastik wird nach Entfernung des verletzten Knorpels der subchondrale Knochen mit einer Kugelfräse abgetragen, um eine Blutung und damit das Einsprossen mesenchymaler Stammzellen zu induzieren.

2.3.4 Osteochondrale Transplantate (OCT)

Besonders posttraumatisch hat sich die Transplantation einer Knorpel-Knochen-Einheit bewährt. Während man im angloamerikanischen Raum die allogenen Transplantate präferiert, nutzt man in Deutschland autologe Transplantate zur Behandlung umschriebener (osteo-)chondraler Defekte (Erggelet und Steinwachs 1998). Bei diesem, auch als OATS (Osteochondral autologous transfer system) bekannten Verfahren werden Knorpel-Knochen-Zylinder aus weniger belasteten Gelenkregionen entnommen und in den Knorpeldefekt eingepresst (Hangody und Fules 2003) (Abb. 10). Die anfänglich viel versprechenden Resultate dieser Methode führten in etwa 30% der Fälle nach zwei bis vier Jahren zur plötzlichen oder allmählichen Verschlechterung des postoperativen Zustandes (Wagner 1972). Als Gründe hierfür sind Passungenauigkeit der transplantierten Zylinder, die ungleiche Wölbung der Knorpeloberfläche und die Größe des Defektes zu erwähnen (Hunziker 2003). Neben der zweiten, iatrogen induzierten Läsion, die sich mit minderwertigem Faserknorpel füllt, zeigen arthroskopische Nachuntersuchungen einen weiteren Nachteil auf: Der Raum zwischen den Knorpel-Knochen-Zylindern wird mit fibrösem Knorpel aufgefüllt (Bobic 1996).

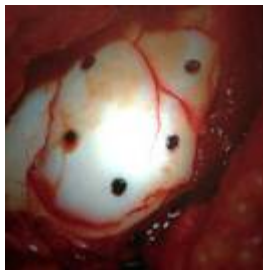


Abb. 8
Refixation zweier Knorpelfragmente an der lateralen Femurkondyle. Aus (Weise 2004)

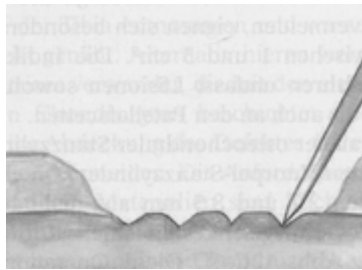


Abb. 9
Schematische Darstellung der Mikrofrakturierung. Aus (Weise 2004)

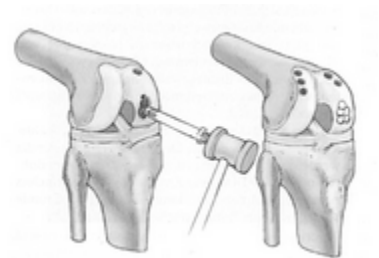


Abb. 10
Mosaikplastik: Entnahme der Knorpel-Knochen-Zylinder (links), Ergebnis der Operation (rechts). Aus (Rüter et al. 2004)

2.3.5 Die autologe Chondrozytentransplantation (ACT)

Als Brittberg und Mitarbeiter (1994) dieses Verfahren vor mehr als zehn Jahren präsentierten, imponierte die Vorstellung, Knorpeldefekte mithilfe einzelner, in der Petrischale vermehrter Chondrozyten kurieren zu können. In einer ersten arthroskopischen Operation wird eine etwa reiskorngroße, vollschichtige Knorpelbiopsie aus einer nichttragenden Gelenkregion entnommen. Nach enzymatischem Verdau der die Proliferation der Chondrozyten beschränkenden Matrix (Sokoloff 1982), werden die Zellen unter Zusatz patienteneigenen Serums für zwei bis drei Wochen unter standardisierten Bedingungen vermehrt. Die Chondrozytensuspension wird in der zweiten, nun offen durchgeführten Operation unter einen auf den Knorpeldefekt genähten Periostlappen injiziert. Dieser stammt von Tibiakopf oder -schaft. Bonaventure und Mitarbeiter (1994) konstatierten, dass das Periost über Wachstumsfaktoren verfüge, die die Redifferenzierung der Chondrozyten regulieren und den Matrixaufbau positiv beeinflussen. Der Periostlappen bildet mit der Knorpelschulter eine „bioaktive Kammer“ (Abb. 12), in der phänotypisch stabile Chondrozyten überleben und eine qualitativ hochwertige Matrix bilden (Dell'Accio et al. 2001, 2003). In der Literatur spricht man von „hyalinartigem“ Knorpel, weil er über die biochemischen Eigenschaften und biomechanische Belastbarkeit des Gelenkknorpels verfügt, ihm jedoch die typische zonale Struktur fehlt (Peterson et al. 2000).



Abb. 11
Schematische Darstellung der Vorgehensweise bei einer ACT. Modifiziert nach (Mandelbaum et al. 1998).

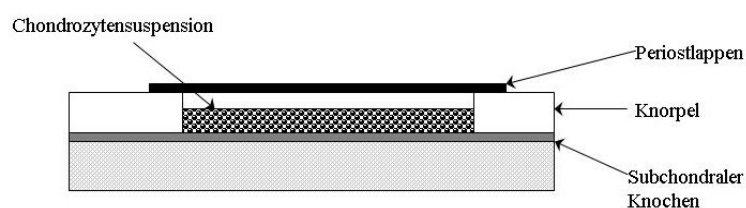


Abb. 12
Bioaktive Kammer, in der die Chondrozyten redifferenzieren können und anschließend knorpeltypische Matrix synthetisieren.

Vergleicht man die ACT mit den anderen potentiellen Therapieverfahren, spricht die in der Literatur präsentierte Datenlage für die Chondrozytentransplantation: Einer der Erstbeschreiber berichtet langfristig (zwei bis neun Jahre) über exzellente bis gute Ergebnisse bei 92% der Nachuntersuchten, die eine durchschnittliche Defektgröße von 4,4 cm² aufgewiesen hatten (Peterson et al. 2000). Auch mittelfristig bestätigt Löhnert (1997) diese Ergebnisse. Im Vergleich mit der Mikrofrakturierung weist die ACT zwar im ersten Nachuntersuchungsjahr schlechtere klinische Befunde auf, die der größeren operativen Traumatisierung geschuldet sein könnten. Ab dem zweiten postoperativen Jahr zeigt sich ein umgekehrter Trend (Knutsen et al. 2004). In Knutsens Studie wurden die Ergebnisse dieser beiden Verfahren auch histologisch untersucht: Wiederum bestätigte sich die Entstehung von Faserknorpel bei der Mikrofrakturierung und hyalin-ähnlichem Knorpel bei der ACT. Auch die Osteochondrale Transplantation scheint der ACT unterlegen: In der von Bentley und Mitarbeitern (2003) veröffentlichten prospektiv randomisierten Studie mit 100 Patienten zeigte die ACT bei einer durchschnittlichen Defektgröße von 4,66 cm² signifikant bessere klinische Ergebnisse als die OCT. Ebenfalls waren nach etwa 19 Monaten häufig die ersten degenerativen Veränderungen bei den OCT-Patienten eruierbar.

Nichtsdestotrotz besitzt dieses Verfahren auch Nachteile: Zum einen ist dies die doppelte operative Belastung des Patienten mit dem entsprechend höheren Risiko einer Infektion. Vor allem besteht dies während der zweiten Operation, in der die Annahrt des Periostlappens über den Knorpeldefekt viel Zeit in Anspruch nimmt. Trotz standardisierter Bedingungen besteht das Kontaminationsrisiko auch während der Knorpelzellproliferation.

Haben die Chondrozyten eine geringe Qualität, d.h. sind sie während der Proliferation zu sehr dedifferenziert, kann das zum Versagen der ACT führen (Dell'Accio et al. 2003). Ein mangelndes Containment, also eine instabile oder insuffiziente Knorpelschulter, können die Knorpelzelltransplantation unmöglich machen (Fritz 2003).

Messner (1999) kritisiert die fehlende oder insuffiziente Anheftung des Regeneratgewebes am subchondralen Knochen und am Umgebungsknorpel in den von Brittberg und Mitarbeitern veröffentlichten Studien (1994, 1996).

2.4 Biomaterialien für die Knorpelzelltransplantation

Vorteilhaft für die Regeneration von Gelenkknorpel ist die Transplantation ganzer funktioneller Gewebe anstelle einzelner Zellen im Sinne des Tissue Engineering (Gaissmaier et al. 2003). Hierbei werden Zellen isoliert, kultiviert und anschließend auf ein Trägermaterial (Scaffold) (Abb. 13) aufgebracht oder aber sofort im Scaffold kultiviert. Weltweit wird in vielen Forschungsgruppen nach einem Material gesucht, welches mit Zellen besiedelt, ein funktionelles artefizielles Knorpeltransplantat bildet.

Das geeignete Trägermaterial sollte hierbei gewisse Anforderungen erfüllen: So darf es keine immunogenen Wirkungen im Körper hervorrufen. Die Matrix sollte resorbierbar sein, ohne schädliche Metabolite freizusetzen. Eine Integration in den umgebenden, gesunden Knorpel müsste ebenso gewährleistet sein wie die einfache Handhabung, Elastizität, zellprotektive Stabilität und Formbarkeit des Materials. Die homogene Besiedlung der Matrix mit Zellen ist ebenfalls Voraussetzung wie die Stabilisierung des chondrozytären Phänotyps durch eine 3-dimensionale Ausrichtung. Nicht zuletzt sollte die Trägermatrix ohne Verlust dieser Eigenschaften sterilisierbar sein.

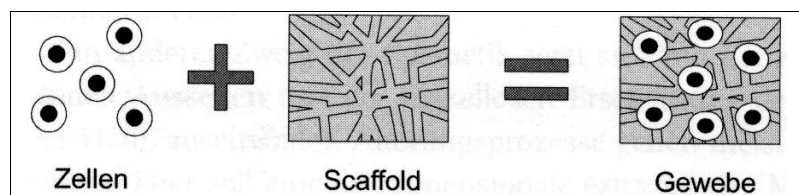


Abb. 13

Künstliche Gewebeherstellung im Sinne des Tissue Engineering: Ein Trägermaterial wird mit Zellen besiedelt, um ein Gewebe zu schaffen.
Aus (Minuth et al. 2003)

2.4.1 Kollagen-basierte Träger

Im klinischen Alltag sind kollagenbasierte Biomaterialien tierischer Herkunft in der ästhetischen Chirurgie und bei der Blutstillung seit Jahrzehnten in Anwendung. Neben den guten Resorptionseigenschaften - die Metabolite sind nicht toxisch - zählt auch die hohe Biokompatibilität zu den Vorteilen der Kollagenscaffolds. So finden Kollagenmembranen als Defektabdeckung bereits klinischen Einsatz.

Bei der Verwendung von Gelatineprodukten, die überwiegend aus denaturierten Kollagenen bestehen, wurde eine deutliche Entzündungsreaktion gefunden (Hunziker 2003), die wahrscheinlich durch Kollagenfragmente induziert ist (Jennings et al. 2001).

Chondrozyten, die in einem Kollagen basierten Träger kultiviert wurden, welcher mit 2% Hyaluronsäure kombiniert war, wiesen eine deutlich größere knorpeltypische Stoffwechselleistung auf. Eine Hyaluronsäurekonzentration von 10% jedoch kehrte diesen Effekt um

(Allemann et al. 2001). Gille und Mitarbeiter (2002) fanden in einer mit Chondrozyten besiedelten Kollagen-Typ-I/Typ-III-Membran 40% apoptotische Zellen.

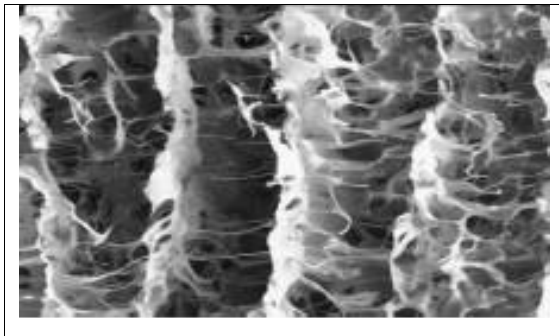


Abb. 14
Struktur der NOVOCART®-Membran der Firma TETEC. Die poröse Oberfläche gewährleistet ein 3-dimensionales Ausbreiten der Chondrozyten und der synthetisierten Matrix. Aus Werbebrochure der Firma TETEC.

Die kommerziell erhältlichen Kollagenmembranen lassen sich aufgrund ihrer Struktur jedoch nur oberflächlich mit Chondrozyten besiedeln. Kollagensuspensionen, die man nach Untermischen von Zellen geliert, zeigen eine homogenere Zellverteilung (Gaissmaier et al. 2003).

Die von Stark et al. (2006) veröffentlichte Publikation prüft die Verwendbarkeit einer quervernetzten Kollagen-Typ-I-Matrix (Matri-

derm®) mit porcinen Knorpelzellen. Sie erzielten positive Ergebnisse bei der histologischen Darstellung der ECM. Typ-II-Kollagen erschien in der Immunhistologie zellnah. Eine mRNA-Expression von Kollagen Typ II war in der RT-PCR schwach nachweisbar.

Eine kürzlich erschienene Studie präsentiert die klinischen Erfolge eines Kollagen-Typ-I-Gels (Andereya et al. 2006): Nach der Inkubation mit Chondrozyten wurde die CaRes®-Membran geliert, für zwei Wochen kultiviert und anschließend in Knorpeldefekte mit einer durchschnittlichen Größe von 6 cm² eingeklebt. Die klinischen Befunde besserten sich zwölf Monaten postoperativ signifikant, sowohl gegenüber der Ausgangssituation als auch den Ergebnissen nach 6 Monaten. Eine histologische Auswertung der Kollagenmembranen wurde in dieser Studie nicht vorgenommen.

2.4.2 Alginat

Dieses aus der Braunalge extrahierte Co-Polymer aus D-Mannuronsäure und L-Guluronsäure lässt sich durch die Zugabe von Kalziumionen gelieren und durch den Entzug dieser wieder verflüssigen. Die für Chondrozyten charakteristischen sphärischen Zellkern bleiben im Alginat erhalten, so dass sogar eine den Phänotyp stabilisierende Wirkung des Alginats angenommen wird (Häuselmann et al. 1992). Auch zeigen dedifferenzierte Chondrozyten im Alginat eine deutliche Redifferenzierungstendenz (Bonaventure et al. 1994). Die Matrixsynthese der im Alginat kultivierten Zellen ähnelt der im nativen Knorpelgewebe (Häuselmann et al. 1996).

Als in vivo verwendetes Biomaterial enttäuscht das Alginat jedoch: Das Tierexperiment löst eine massive Fremdkörperreaktion aus, die eine Anwendung am Menschen zu gefährlich erscheinen lässt (Hunziker 2003).

2.4.3 Fibrin

Das polymerisierte Fibrinogen bildet ein 3-dimensionales Netzwerk mit geringer intrinsischer und mechanischer Stabilität. Die aus seinem Abbau entstehenden Metaboliten sind physiologisch und nicht toxisch. Fibrin kann jedoch eine pro-inflammatorische Wirkung entfalten und damit eine Immunreaktion hervorrufen (Meinhart et al. 1999).

Ein Tierexperiment zeigte, dass Fibrin beim Kontakt mit Chondrozyten auch zum Knorpelabbau führen kann (Peretti et al. 2000). Der kommerziell erhältliche Fibrinkleber hat wegen seiner unphysiologisch hohen Fibrinkonzentration hemmende Wirkung auf die Zellproliferation (Homminga et al. 1993) und die Synthese der Extrazellulärmatrix (Gaissmaier et al. 2003).

Perka und Mitarbeiter (2000) kombinierten Fibrin mit Alginat. Die in diesem Mischgel kultivierten Chondrozyten behielten einerseits ihren Phänotyp und produzierten ein „semisolid“ Gewebe, was auch nach Herauslösen des Alginats stabil blieb.

2.4.4 PLA-/PGA-Polymere

Bereits seit zwei Jahrzehnten sind synthetische Biomaterialien Gegenstand der Forschung. Polymilchsäure (PLA) und Polyglykolsäure (PGA) sind nicht-tierischer Herkunft und bestehen durch eine große Primärstabilität und Wandlungsfähigkeit: Die chemische Modifikation erlaubt die Alteration der Oberfläche. So sind fibrilläre Maschenwerke ebenso denkbar wie poröse Schwämme. Jedoch bleibt die Adhäsion von Zellen gering und verhindert somit die Integration von zellfreien Scaffolds in einen Knorpeldefekt (Hunziker 2003). Bei der Degradation des Biomaterials entstehen saure Valenzen, die den pH-Wert der Umgebung senken. Im Tierexperiment rufen die Abbauprodukte inflammatorische Prozesse mit Riesenzellreaktion hervor, sogar eine zytotoxische Wirkung ist nicht auszuschließen (Sittinger et al. 1996). In den Trägermatrices fanden Gaissmaier und Mitarbeiter (2003) sowohl den chondrozytären und fibrozytären Phänotyp, beschrieben die rasche Dedifferenzierung und geringe Adhäsion der Zellen.

Die Arbeit von Kaps und Mitarbeitern (2004) präsentiert die molekulare Charakterisierung humaner Chondrozyten, die nach Proliferation in einer Monolayerkultur auf Polyglactin/Polyvidioxanon-Vliese übertragen wurden, um für weitere vier Wochen in vitro, später

auch in vivo (nu/nu-Mäuse) kultiviert zu werden. Die qRT-PCR zeigt eine hohe Kollagen-Typ-I- und -Typ-III-mRNA-Expression auch nach 3-D-Kultur. Die chondrozytären Charakteristika Aggrekan und Typ-II-Kollagen waren in den Monolayerkulturen reprimiert, wurden in der 3-D-Kultur reinduziert. Immunhistologisch zeigte sich eine perizelluläre Kollagen-Typ-II-Expression.

In kürzlich veröffentlichten Studien wurden PLGA-Matrices im Sinne eines osteochondralen Implantats mit anderen Biomaterialien kombiniert: Hsu und Mitarbeiter (2006) modifizierten PGLA-Träger mit Kollagen Typ II und einem Arginin-Glyzin-Aspartat-haltigen Protein, besiedelten sie mit Chondrozyten und implantierten diese Konstrukte in Knorpeldefekte von Kaninchen. Während die Zellproliferation in den proteintragenden Scaffolds inhibiert erschien, war diese in den Kollagen-Typ-II-PGLA-Trägern ebenso unbeeinträchtigt wie die Matrixsynthese. Des Weiteren zeigte sich bei letzteren keine inflammatorische Reaktion im Gegensatz zu den unveränderten und Protein assoziierten Implantaten.

Weniger optimistische Ergebnisse erzielt die in vitro Studie von Terada und Mitarbeitern (2005): Die Gruppe kombinierte PGA-Träger mit Hydrogelen auf Kollagen-Typ-I, Methylzellulose- und Alginatbasis. In der histologischen Auswertung nach bis zu sechs Wochen Kultur erzielten die Kombinationsscaffolds keine signifikant besseren Ergebnisse als die reinen PGA-Träger.

2.4.5 Weitere synthetische Materialien

Ein entscheidender Vorteil von Materialien wie Dacron (Polyethylenterephthalat), Teflon (Polytetrafluorethylen) und Karbonfasern ist die große Strukturvariabilität: Es sind u.a. fibrilläre Netze, Membranen, Mikrosphären und Schwämme mit variierender Porengröße herstellbar. Sie haben wegen ihrer meist enttäuschenden Ergebnisse in Tierexperimenten und der unbefriedigenden Biokompatibilität bisher in wenigen Arbeitsgruppen Beachtung gefunden (Hunziker 2003). Ein weiteres Betätigungsfeld ist die Entwicklung und Erforschung nanotechnologischer Trägersubstanzen: Li und Mitarbeiter (2005a, 2005b) konnten nachweisen, dass sich mesenchymale Stammzellen in Anwesenheit von TGF- β in einem porösen Scaffold zu Chondrozyten differenzierten und eine knorpeltypische Extrazellulärmatrix produzierten.

2.5 Entwicklung eines trägergebundenen Chondrozytenimplantats

2.5.1 Spongostan®

Auf der Suche nach einem für die Entwicklung eines Chondrozytenimplantats geeigneten Biomaterials untersuchten wir Spongostan® Pulver, welches sich als Hämostyptikum seit Jahrzehnten in klinischer Anwendung bewährt hat (Light und Prentice 1945, Paganelli et al. 2006).

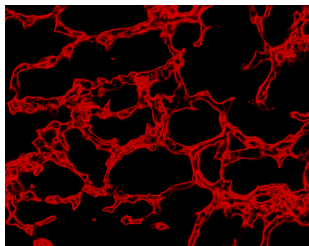


Abb. 15
Histologische Aufnahme
von Spongostan® im pola-
risierten Licht. 40-fache
Vergrößerung

Es besitzt die besten Eigenschaften eines Trägermaterials: Es in steriler Form kommerziell erhältlich, es sind weder allergische Reaktionen noch Einflüsse auf die Wundheilungsstörung beschrieben (Peterson et al. 1988). Spongostan® ist innerhalb weniger Wochen resorbierbar und biokompatibel. Auf der Basis gereinigter porciner Gelatine zeigt Spongostan® Pulver eine schwammartige Struktur (Abb. 15) mit gleichmäßiger Porosität (Packungsbeilage Spongostan®, Johnson & Johnson Medical). In

Verbindung mit Flüssigkeiten entwickelt sich das Pulver zu einer weichen, formbaren Masse.

Goodstone und Mitarbeiter (2004) zeigten in der einzigen bisher erschienen in vivo Studie neben der homogenen Besiedelbarkeit des Spongostan®-Schwämmen mit primären bovinen Chondrozyten die Verträglichkeit von Zellen und Material. In mit Hyaluronsäure modifizierten Spongostan®-Schwämmen stieg die Zellzahl nach 28 Tagen Kultur etwa um das Doppelte im Vergleich zu den nativ belassenen Schwämmen, die die Proliferation der Chondrozyten unterstützten. Die Matrixsynthese, die immunhistologisch und mit dem DMB-Assay geprüft wurde, gestaltete sich in ähnlicher Weise. In der qualitativen RT-PCR waren sowohl in den nativen als auch in den modifizierten Schwämmen die mRNA-Expression von Aggrekan und Kollagen Typ II, nicht aber von Typ-I-Kollagen nachweisbar. Die Arbeitsgruppe zeigte damit, dass primäre bovine Chondrozyten, die in Spongostan® kultiviert wurden, nicht dedifferenzieren.

2.5.2 Kultivationsystem

Ein erster Versuch, die mit Chondrozyten besiedelte Spongostan®-Masse zwischen zwei mit einander vernähten Kollagenmembranen zu kultivieren (Abb. 16), misslang wegen häufiger Kontaminationen.

Ein weiteres Manko der genähten Kulturkammer war die feh-

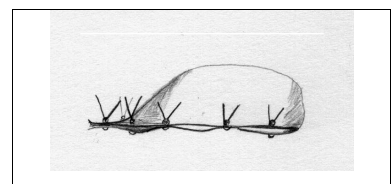


Abb. 16
Modell der ersten Kulturkam-
mer: Eine KollagenMembran ist
mit 4-0 PDS zu einer Tasche
vernäht, in der die Chondrozy-
ten-Spongostan®-Masse liegt.

lende Wasserdichtigkeit, so dass eindringendes Medium die Matrix verflüssigte und ein Ausschwemmen dieser zwischen den Nähten nicht zu verhindern war.

Das mit diesen Nachteilen behaftete Kultursystem erlaubte jedoch die Aussage, dass die Chondrozyten-Spongostan®-Masse nach nur wenigen Tagen der Kultur an der Kollagen-Membran adhärent ist.

Die Idee, die in die Spongostan® - Matrix gesäten Chondrozyten zwischen zwei semipermeablen Membranen zu kultivieren, blieb. Jedoch sollte die zweite als Kammerwand dienende Membran keine adhärierenden Eigenschaften zeigen, um ein implantierbares, membrangebundenes Konstrukt zu entwickeln. Ein Dialyseschlauch gewährleistete diese Anforderungen. Um diesen gegen die Kollagenmembran fixieren, verwendeten wir Minusheets®. Sie stellen ein industriell gefertigtes, in der Zellkultur anwendbares und einfach zu handhabendes System dar. Dieses erlaubt aufgrund seines einem Stickrahmen ähnlichen Prinzips das Fixieren zweier Membranen gegeneinander, sowie einen wasserdichten Schutz des zwischenliegenden Kulturguts (Minuth et al. 2003) (Abb. 17). Eine mehrfache Verwendung der Minusheets® ist durch deren Autoklavierbarkeit möglich.

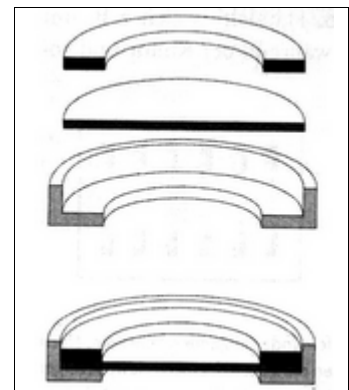


Abb. 17
Schematisch dargestelltes
Prinzip der Minusheets®.
Aus (Minuth et al. 2003)

3. Fragestellungen der Arbeit

Bei der Weiterentwicklung der Autologen Chondrozytentransplantation ist die Entwicklung eines bioartefiziellen, hochfunktionellen Chondrozytenimplantats das Ziel vieler Forschungsgruppen weltweit. Es sind hierbei die unterschiedlichsten Materialien und Materialkombinationen im Einsatz, nicht zuletzt auch kollagen-basierte Matrices wie die Gelatine.

In der vorliegende Arbeit wurde das aus porciner Gelatine herstellte Hämostyptikum Spongostan® Pulver vor dem Hintergrund der folgenden Fragestellungen untersucht:

- Gelingt es, Chondrozyten in Anwesenheit von Spongostan® zu kultivieren?
Wenn ja, zeigen die als Monolayer kultivierten Zellen in Anwesenheit von Spongostan® einen veränderten Phänotyp?
- Ist es möglich, ein stabiles, membranverankertes Chondrozytenimplantat auf der Basis von Spongostan® herzustellen?
- Sind immunhistologische und molekularbiologische Untersuchung knorpelspezifischer Marker, sowie die Messung der Glykosaminoglykan-Konzentration hinweisend auf eine ideale Kultivationsdauer?

4. Material

4.1 Geräte

Analysenwaage	Sartorius BP 121 S, Göttingen
Autoklav Typ GE 66	Geringe, Berlin
Brutschrank INCO	Heraeus Instruments
Eismaschine	Scotsman FRIMON AF 80
Heizblock	ThermoStat plus, Eppendorf, Köln
Kamera	Digitalkamera AxioCam HR color, Carl Zeiss
Kühlschrank –20°C	Liebherr
Magnetrührer	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Microflow Laminar Flow Workstation (Zellkulturwerkbank)	Nunc, Wiesbaden
Microtom	Microm Typ HM 355
Mikroplate Reader Model 550	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mikroskop	Zeiss Axiovert 200M
Multicolor Real-time Detection System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Paraffinbehälter mit Wärmeplatte	Leica EG 1120
pH-Meter	HI 8014 HANNA instruments
Photometer SFM 25	Bio-Tek Instruments, Winooski, USA
Spektrophotometer Smart Spec™3000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Thermoblock Thermo Stat	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Wasserbad	MEMMERT, Schwabach
Wasser-Filtrieranlage	TKA-LAB Reinstwassersystem Typ HP 6UV/VF
Zählkammer Fuchs-Rosenthal	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Zentrifuge Eppendorf 5804 R	Wesseling-Berzdorf

4.2 Verbrauchsmaterialien

12-well-Platten	Falcon®, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
96-well-Platten	Nunc, Dänemark
BioGide®-Kollagenmembranen	Geistlich Biomaterials, Baden-Baden
Dialysemembranen, 16mm, MWCO 3500	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Kulturflaschen (750 ml)	BD Falcon®, Biosciences, Bedford, USA

Kulturflaschen (50 ml)	Becton Dickinson, Falcon®, Franklin Lakes, USA
Minusheet Kulturkammer	Minucells and Minutissue GmbH, Bad Abbach
Spongostan® Powder	Ferrosan, Soeborg, Dänemark
Super Frost® Plus Objektträger	Menzel-Gläser®
Pasteurpipetten, ungestopft	Carl Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen	Eppendorf, Köln
Serologische Pipetten (1-25ml)	Greiner, Nürtingen
Tissue-Tek® O.C.T™ Compound	Sakura Finetek Germany GmbH, Heppenheim
Tubes (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml)	Eppendorf, Köln

4.3 Chemikalien

Albumin Fraktion V	Merck KgaA, Darmstadt
Chloroform	Merck KgaA, Darmstadt
Collagenase P	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Ethanol, unvergällt	Apotheke Waldkrankenhaus „Rudolf Elle“, Eisenberg
Gentamicin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hyaluronidase aus Rinderhoden	Sigma, Taufkirchen
Isopropanol	Merck KgaA, Darmstadt
NaCl	Merck KgaA, Darmstadt
NaHCO ₃	Merck KgaA, Darmstadt
ProLong ® Antifade Kit	Molecular Probes
Pronase E	Merck KgaA, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck KgaA, Darmstadt
TRIzol® Reagent	Invitrogen Life Technologies

4.4 Testkits

Omniscript® RT Kit (200)	Qiagen, Hilden
iQ™ SYBR®Green Supermix	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

4.5 Puffer, Lösungen und Kulturmedien für die Zellkultur

DMEM F-12	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Fötale Kälberserum (FCS) GIBCO® BRL	Invitrogen Life Technologies

Phosphat gepufferte Saline (PBS)	2 Liter:	16,0 g NaCl
		2,37 g Na ₂ HPO ₄
		0,4 g KCl
		0,4 g KH ₂ PO ₄
	pH-Wert: 7,4, sollte sofort nach dem Ansetzen eingestellt werden, sofortiges Autoklavieren bei 125°C für 20 min	

4.6 Ansätze für den DMB-Assay

DMB Reagenz	16 mg 1,9-DMB in 5 ml Ethanol, 2 ml Ameisensäure und 2 g Natriumformiat in 20 ml a.d. lösen Ansätze vereinen, mit H ₂ O auf 1 l; pH 6,8
DMB Standard	DMB Stammlösung 20 µg/ml in Verdünnungspuffer
DMB-Verdünnungspuffer	0,05 M Natriumacetat; 0,05% Tween 20 in 500 ml Reinstwasser; pH 6,8
Guanidin Hydrochlorid – Natriumacetat	2,88 M Guanidinhydrochlorid mit 0,05 M Natriumacetat auf 100ml auffüllen; pH 6,8

4.7 Antikörper

Alexa Fluor 488 Anti Mouse IgG	Molecular Probes; Invitrogen Karlsruhe
Alexa Fluor 594 Anti Maus IgG	Molecular Probes; Invitrogen Karlsruhe
Monoclonal anti-human Aggrecan-Antibody, Clone: HAG7D4	Acris Antibodies, Hiddenhausen
Monoclonal anti-human Type II Collagen-Antibody, Clone: II-4C11	Calbiochem, San Diego, USA
Monoclonal anti-human Type I Pro-Collagen, Clone: 1913	Fitzgerald, Concord, USA

4.8 Computersoftware

Adobe Photoshop Version: 8.0.1	Adobe Systems Inc.
Adobe Acrobat 7.0 Professional	Adobe Systems Inc.
AxioVision Release 4.4	Carl Zeiss
Endnote 8.0	Wintertree Software, Inc.
iCycler iQ Optical System Software, Version 3.1	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Microplate Reader	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Microsoft Office 2003	Microsoft Inc.
SigmaPlot 9.0	SYSTAT Software Inc.
SigmaStat 3.0	SPSS Inc.

5. Methoden

5.1 Versuchsablauf

5.1.1 Knorpelpräparation

Die verwendeten Rinderknie wurden bereits im Schlachthof gehäutet, Tibia und Femur diaphysär auf eine Länge von etwa 15 cm gekürzt.

Nach gründlicher Desinfektion mit 70%-iger alkoholischer Lösung eröffnete ein horizontaler Schnitt unter Durchtrennung der Ligamenta collaterale mediale und laterale, der Ligamenta patellae mediale, intermedium und laterale die Gelenkhöhle in Höhe beider Menisci (Abb. 18).

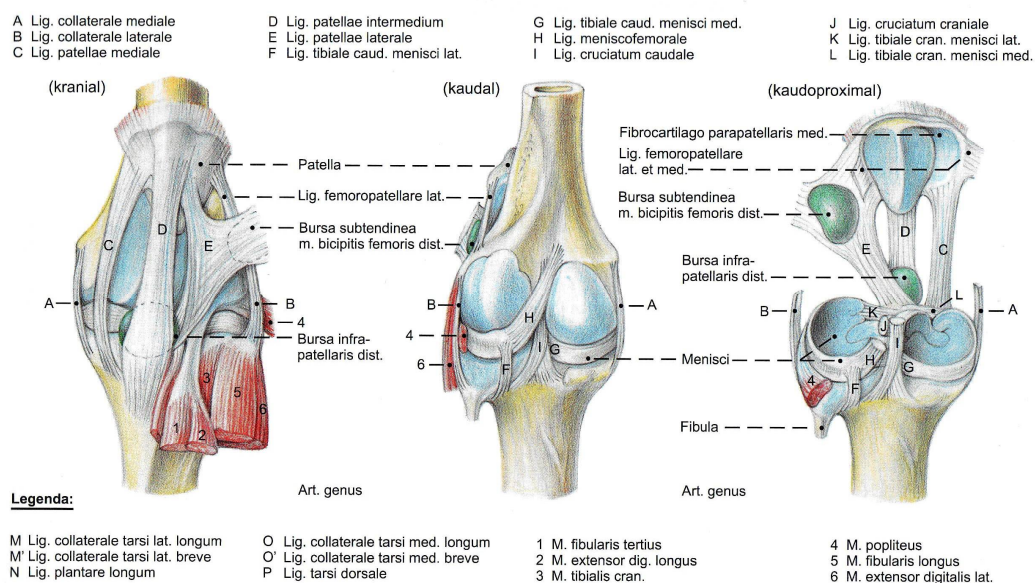


Abb. 18

Anatomie des bovinen Kniegelenkes. Aus (Budras und Wünsche 2002)

Um die Tibia gegen den Femur zu flektieren, war eine Durchtrennung des Ligamentum meniscofemorale und der beiden Kreuzbänder (Ligg. cruciatum craniale et caudale) notwendig (Abb. 19).

Unter Verwendung eines neuen, sterilen Skalpells wurden etwa 1,5-2 cm² große Knorpelschüppchen vom subchondralen Knochen der Femurkondylen geschält (Abb. 20) und in Gentamycin (50µg/ml) versetzten Dulbecco's modified Eagles Medium gesammelt. Makroskopisch osteoarthrotisch oder unterblutet erscheinende Gelenkregionen wurden nicht abgeerntet.



Abb. 19
Femur mit flektierter Tibia (oben)

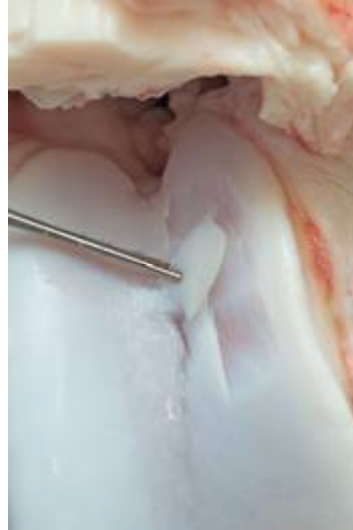


Abb. 20
Präpariertes Knorpelschüppchen

5.1.2 Verdau des Knorpels

Zur Gewinnung einzelner für die Kultur verwendbarer Chondrozyten war ein enzymatischer Verdau der Knorpelzellmatrix notwendig. Die Destruktion der Knorpelmatrix begann in serumfreiem, Pronase E versetztem Medium. Der Ansatz verweilte unter gleichmäßigen Rührbewegungen für eine Stunde im Brutschrank bei 37°C, mit 5 %-iger CO₂ -Umflutung und 95 % Luftfeuchtigkeit.

Anschließend wurden die angedauten Knorpelschüppchen mehrmals mit Gentamycin versetztem PBS (50 µg/ml PBS) gewaschen, um nun ein mit Kollagenase P (Fa. Roche; 0,1 mg/ml Medium) angereichertes, FCS-haltiges Medium hinzu zu geben. Dieser Ansatz verblieb 17 Stunden im Brutschrank.

Nach Überführen der Verdauungslösung in einen 50 ml Cellstar® - Tube (Fa. Greiner) folgte das fünfminütige Herabzentrifugieren der Zellen bei 1500 rpm und Verwerfen des abpipettierten Überstands. Ein Resuspendieren des Pellets mit Gentamycin versetzten PBS diente der Entfernen eventueller Kollagenase- oder Knorpelstückreste. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Chondrozytenpellet in serumhaltigem Medium resuspendiert.

Es schloss sich eine Zellzahlbestimmung in der Fuchs – Rosenthal – Zählkammer an: Ausgezählt wurden die vitalen Chondrozyten (siehe Abb. 21 u. 22). Unter Zuhilfenahme der folgenden Formel erhielt man die Anzahl der Chondrozyten in der bestehenden Lösung:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \text{gezählte Chondrozyten} \times 5000 \times \text{Verdünnung}$$

Die Zellen wurden nun entsprechend der im anschließenden Experiment gewünschten Zelldichte in FCS-haltigen Medium in einem 50-ml-Plastikröhrchen ausgesät, welches eine Adhäsion der Zellen am Gefäßboden verhindert, und verblieben für vier Stunden im Brutschrank.

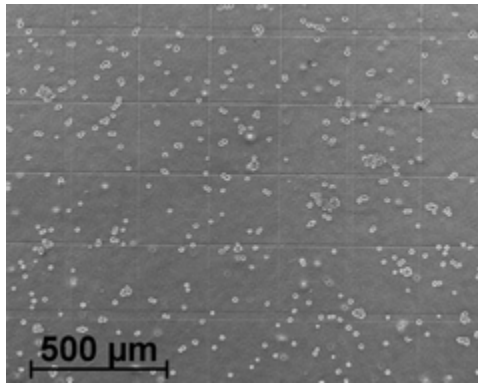


Abb. 21
Schema der Fuchs – Rosenthal - Zählkammer
im Phasenkontrast.

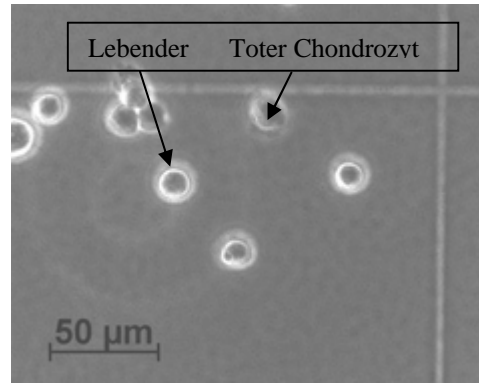


Abb. 22
Vergrößerte Aufnahme, Beispiele für die
lichtmikroskopische Morphologie eines toten
und eines vitalen Chondrozyten

5.1.3 Herstellung der Spongostan® - Chondrozyten - Masse

Bei der Herstellung eines idealen Spongostan®-Chondrozyten-Gemisches galt es zwei Anforderungen zu erfüllen: 1. Dem Original-Knorpel nahe kommende Chondrozytenzahl pro Volumen, sowie 2. einer großen Plastizität der Masse mit gewährleisteter mechanischer Stabilität. Histologische Voruntersuchungen zeigten, dass sich eine Zellzahl von 4 Millionen Chondrozyten pro Kulturkammer dem nicht pathologisch veränderten Rinderknorpel am ähnlichsten war. Eine Kulturkammer enthielt etwa 25 - 30 mg Spongostan® (Trockengewicht) auf einer Fläche von 1 cm². Die größte Stabilität, ohne eine Tendenz zur weiteren Quellung bis hin zur Auflösung, zeigte das Spongostan® bei einem Mischungsverhältnis von 1:6, d.h. 100 mg Spongostan® wurden mit 600 µl Medium vermischt. Es erwies sich als praktikabel, die benötigten Knorpelzellen zu suspendieren und auf die entsprechende Menge Spongostan aufzutropfen und vorsichtig unterzukneten (Abb. 23). Eine Durchmischungszeit von 120 Sekunden erschien ausreichend.

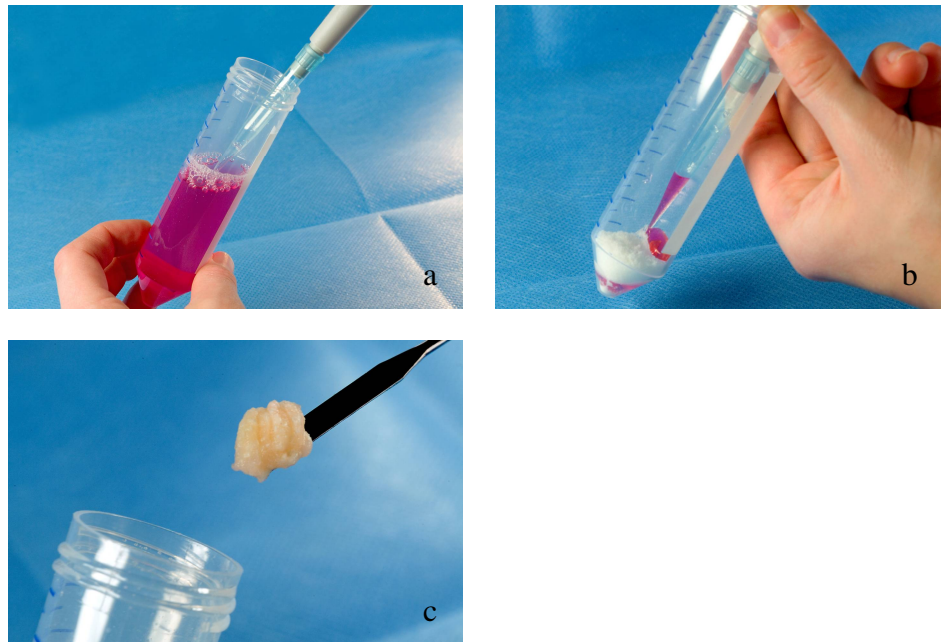


Abb. 23

Herstellung der Spongostan-Chondrozyten-Masse: a. Chondrozytensuspension in adäquater Zelldichte, b. Eintropfen der Suspension auf das Spongostan-Puder, c. Entnahme der für 120s gekneteten Spongostan-Chondrozyten-Masse, die für anschließende Experimente zur Verfügung steht.

5.1.4 Herstellung der Kultivationskammer

Hierbei kam ein Kultivationssystem bestehend aus dem Minusheet®, einer Kollagen- und einer Dialysemembran zur Anwendung. Das Prinzip des Minusheet®, welches im Tissue Engineering entwickelt wurde, ähnelte dem eines Stickrahmens: Zwischen zwei ineinander passenden Ringen werden Gewebe gespannt und gegeneinander arretiert.

Der größere, schwarze Ring nahm die auf einen Durchmesser von 6,5 mm gestanzte BioGide-Membran auf, wobei deren glatte, mit der Prägung „up“ versehene Seite die spätere Außenseite der Kulturkammer markierte (Abb. 23). Die angefertigte Spongostan-Chondrozyten-Masse wurde mit einem scharfen Löffel zu einer 3 mm großen Kugel geformt, mittig auf der angerauten Seite der Kollagenmembran positioniert und eine feucht autoklavierte, rund gestanzte Dialysemembran (9 mm Durchmesser, MWCO 3500 KD) aufgelegt. Der kleinere weiße Ring verschloss das Kultursystem, indem er mit der 7-mm-Rundstanze in den größeren Ring gepresst wurde. Aus dem Kultursystem quellendes Spongostan musste entfernt werden, um das Kulturmedium nicht zu trüben. Die Kultivierung erfolgte in 12-Well-Platten (3 ml Medium/Well) für sieben, 14 bzw. 28 Tage im Brutschrank bei 37°C, 5%-iger CO₂-Umflutung und 95%-iger Luftfeuchtigkeit.

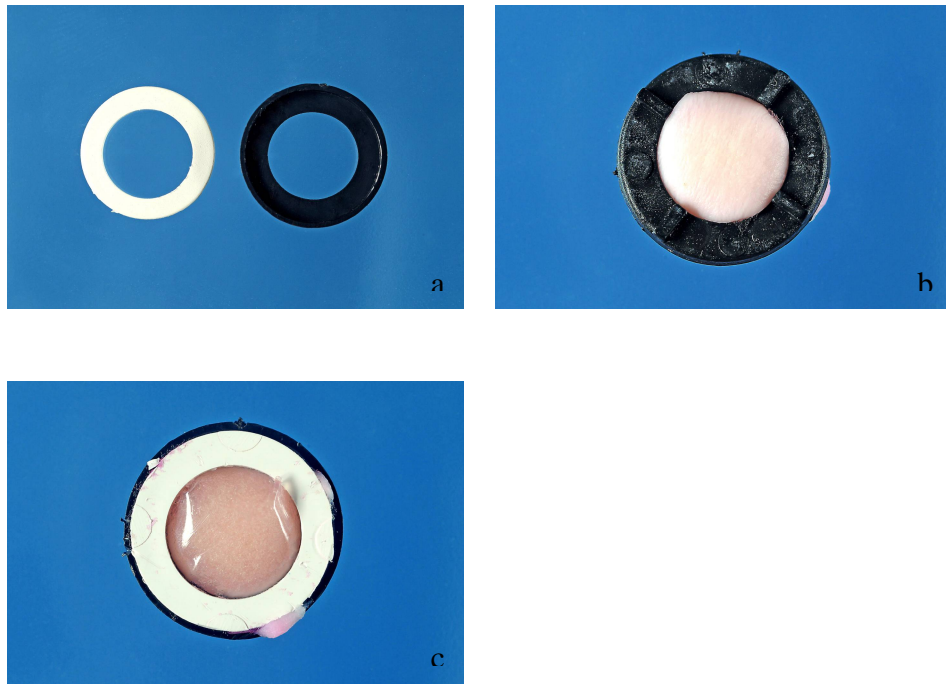


Abb. 24

Die als Kulturkammer dienenden Minusheets®: a. Beide Ringe der Kulturkammer. Der größere, schwarze Ring nimmt den weißen auf. b. Ansicht der Rückseite des geschlossenen Systems mit der Kollagenmembran. c. Ansicht der Vorderseite mit dem transparenten Dialyseschlauch.

Die Auswertung der Versuchsansätze stützte sich einerseits auf histologische, andererseits auf biochemische und molekularbiologische Methoden.

5.2 Histologische Methoden

5.2.1 Herstellung von Kryostat-Schnitten

Um ein unnötiges Schrumpfen der darzustellenden Gewebe und damit eine Verfälschung des makroskopischen Eindrucks zu vermeiden, wurden die Gefrier- den Parafinschnitten vorgezogen. Neben dem negativen Einfluss der für die Parafinschnitte verwendeten Reagenzien auf die Antigenität (Romeis 1989), spielten bei der Wahl des Verfahrens auch die erhebliche Zeitersparnis, sowie die einfachere Handhabung der Gefrierschnitttechnik eine ausschlaggebende Rolle. Die Präparate, ein halbiertes Injektionsgefäß, wurden ohne weitere Vorbehandlung in bereits angefrorenem Tissue-Tek® eingebettet und das weitere Erstarren der Masse abgewartet. Nach vollständigem Durchfrieren erfolgte die Anfertigung von 6 bis 20 µm dicken Schnitten mit dem Leica-CM-1100. Nach einer Trockenzeit von etwa 24 Stunden schlossen sich die nachfolgenden Färbungen an.

5.2.2 Histologische Färbemethoden

5.2.2.1 Färbung mit Hämatoxylin – Eosin (HE-Färbung)

Die HE-Färbung diente in einem ersten Schritt der Prüfung des Vorhandenseins von Knorpelzellen und von deren Verteilung im Spongostan nach differierender Kulturdauer. Die Färbung begann mit Übersichten der Objektträger mit dem die DNA blau färbenden Hämatoxylin, vorliegend im Ansatz nach GILL, für zehn Minuten. Das Bläuen mit lauwarmem Leitungswasser folgte. Es schloss sich die Eosinfärbung, mit einer Einwirkzeit von 10 Minuten, an, um das Cytoplasma und die Kollagenfasern zu markieren. Nach einer Spülung mit a.d. wurde die aufsteigende Alkoholreihe (70-100%-iger Alkohol, je 10 Minuten) angeschlossen, um verbliebene, ungebundene Farbreste sicher zu entfernen. Danach ruhten die Präparate zweimalig für zehn Minuten in Xylol. Abschließend wurden sie im noch feuchten Zustand mit dem Eindeckmedium DPX® und einem Deckgläschen haltbar gemacht. Da die HE-Färbung zwar Aufschluss über das Vorhandensein sowie die Verteilung der Chondrozyten im Spongostan gibt, mit Nichten jedoch eine Schlussfolgerung auf den spezifischen Aufbau der extrazellulären Matrix der Chondrozyten erlaubt, wurden im Rahmen der weiteren Aufarbeitung der Kryostate immunhistochemische Methoden angewendet.

5.2.1.2 Färbungen mit 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)

Die Bindung des verdünnten Farbstoffes (0,5µg/ml a.d.) an die DNA verursachte eine Verstärkung der Fluoreszenz, die sich durch die Interaktion über Wasserstoffbrückenbindung erklärt. Kubista und Mitarbeiter (1987) beschrieben die Affinität DAPIs zu Adenosin-Thymindin-reichen Arealen der DNA.

Die mit DAPI überschichteten Präparate inkubierten für fünf Minuten bei Raumtemperatur und wurden anschließend mit a.d. gewaschen. Um ein Ausbleichen der Fluoreszenz zu vermeiden, war nach einer kurzen Trocknung der Präparate bei 40°C eine Eindeckung mit dem Eindeckmedium Antifadekit® notwendig.

5.2.1.3 Färbung mit Propidiumiodid

Bindet Propidiumiodid an die DNA, erhöht sich die Fluoreszenz des Farbstoffes. Es dringt lediglich in Zellen ein, deren Membran nicht intakt ist, sei es aufgrund einer Apoptose, Nekrose oder aber einer mechanischer Alteration wie der histologischen Schnitttechnik.

Die Präparate wurden mit dem verdünnten Farbstoff (10µg Propidiumiodid/ml PBS) überschichtet und für 10 min bei 37°C inkubiert. Nach ausgiebigem Waschen mit a.d. trockneten die Schnitte auf der 40°C warmen Heizplatte, um anschließend mit Antifadekit eingedeckt zu werden.

5.2.3 Immunhistologie

Dieses histologische Prinzip kam zur spezifischen Darstellung folgender antigenen Komponenten der chondrozytären Matrix zum Einsatz: Kollagen Typ II, Pro-Kollagen Typ I sowie Aggrekan.

5.2.3.1 Kollagen Typ II

Um Aufschluss über den Phänotyp der in das Spongostan gesäten Zellen zu gewinnen, erschien es notwendig nach der Existenz von Kollagen II zu suchen, welches ein Hauptbestandteil des hyalinen Gelenkknorpels ist (Buckwalter, 1998). Der verwendete, monoklonale Antikörper Clone II- 4C11 wurde nach einstündiger Vorbehandlung mit 0,1%-iger Hyaluronidase (Verdünnung mit PBS) zur enzymatischen Demaskierung der Kollagenfasern, in einer Verdünnung von 1:50 (µl Antikörper/3%-iges Tris-Albumin) aufgetragen. Der Ansatz verweilte über Nacht bei 4°C Kühlung.

Nach mehrmaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem fluochromierten, monoklonalen Zweitantikörper für drei Stunden bei Raumtemperatur.

Um Schlussfolgerungen treffen zu können, ob es einen histologisch sichtbaren Zusammenhang zwischen dem Kollagen Typ II und den ausgesäten Zellen gibt, wurde DAPI zur Darstellung der Knorpelzellkerne benutzt.

5.2.3.2 Pro – Kollagen Typ I

Nach einer einstündigen Vorbehandlung der Präparate mit 0,1%-iger Hyaluronidase und nachfolgend aufgetragenem, 1:50 verdünnten monoklonalen Antikörper gegen Pro-Kollagen-Typ I (Clone: 1913) verweilte das Experiment über Nacht bei 4°C. Nach mehrmaligen Waschen der Gefrierschnitte wurden diese mit dem Zweitantikörper überschichtet und drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Detektion der Zellkerne schloss sich nach mehrmaligem Waschen mit a.d. die Färbung mit DAPI an.

5.2.3.3 Aggrekan

Nach einer Demaskierung der antigenen Epitope mit 0,5M NaOH (10 min) sowie dem fünfmaligen Waschen mit PBS, wurde der monoklonale Antikörper (Verdünnung 1:20 in 3%-igem TRIS-Albumin) aufgetragen und über Nacht inkubiert. Dem mehrmaligen Waschen der Präparate mit PBS folgte die dreistündige Inkubation des fluorochromierten Zweitantikörpers bei Raumtemperatur. Die Zellkerne wurden abschließend mit Propidiumiodid zur Darstellung gebracht.

Zur Auswertung der angefertigten histologischen Präparate wurde das Mikroskop Axiovert 200M (Fa. Carl Zeiss) und die dazugehörige Software - AxioVision 4.4 - benutzt.

5.3 Biochemische Charakterisierung der Zellkulturen

Bei der Analyse der Chondrozyten-Spongostan-Kulturen lag das Augenmerk einerseits auf der Bestimmung der Glykosaminoglykan-Konzentration, andererseits auf Expression charakteristischer Gene. Zusammen mit den histologischen Untersuchungen erlauben selbige eine umfassende Aussage über die Verwendbarkeit von Spongostan® als Chondrozyten tragende Matrix.

Auf eine Bestimmung des Kollagengehaltes wurde verzichtet, da die Spongostan®-Matrix den Hauptanteil des gemessenen Kollagens stellen würde.

5.3.1 Papain-Verdau

Um die matrixgebetteten Zellen den Analysen zugänglich zu machen, wurden sie unter Zuhilfenahme der Cystein-Protease Papain verdaut. Das Enzym wurde hierzu in einem mit 5 mM L-Cystein versetzten Papain-Puffer auf eine Endkonzentration von 125 µg/ml verdünnt. 300 µl dieser Lösung wurden zum Verdau eines Viertels des Kulturkammerinhalts (ca. 50 mg) eingesetzt. Dieser Ansatz inkubierte über Nacht bei 60°C (Farndale et al. 1982). Die mit dieser Methode vorbehandelten Proben wurden mit der folgenden Untersuchung analysiert.

5.3.2 DMB – Assay

Diese von Chandrasekhar et. al (1987) beschriebene Methode dient der Quantifizierung der Glykosaminoglykane (GAG). Grundlage des Verfahrens ist die Absorptionsverschiebung des Farbstoffes 1,9-Dimethylenblau (DMB) in Gegenwart negativ geladener Gruppen. Die Methode darf als spezifischer Nachweis von GAGs gelten, da diese über eine Vielzahl von negativen Ladungen verfügen.

In einer 96-Well-Platte nahmen die Reihen A und H eine Standardkurve auf, anhand derer die Konzentrationen der unbekannten Proben ermittelt werden konnten. Ein Na-Azetat-Puffer diente als Verdünnung und Nullwert (Blank). Zur Stabilisierung des Farbstoffes wurde jedes belegte Well mit 15 µl Guanidin/HCl belegt und abschließend 200 µl DMB pro Well zupipettiert. Die Messung der Absorption und Berechnung der unbekannten Konzentrationen erfolgte am Biorad Microplate-Reader bei 525 nm.

5.4 Molekularbiologische Methoden

5.4.1 Isolierung der RNA

Bei der Arbeit mit RNA war wegen der Gefahr der enzymatischen Hydrolyse der Nukleinsäure durch ubiquitär vorkommende RNasen auf eine RNase-freie Umgebung zu achten. Diese sollte durch das Tragen von Handschuhen und Verwenden von RNase-freien Utensilien (Tubes, Reagenzien) gewährleistet sein. Da sich RNasen auch nach dem Autoklavieren renaturieren können, sollten alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt werden. Die im Spongostan[®] kultivierten Chondrozyten wurden durch die Zugabe von 1 ml TRIzol (Fa. Invitrogen Life Technologies) lysiert, die enthaltenen Proteine denaturiert, um einen Abbau der RNA zu vermeiden (Chomczynski und Sacchi 1987).

Die TRIzol-Proben könnten bei -20°C einen Monat konserviert werden.

Folgende Einzelschritte wurden nacheinander absolviert:

1. An das Auftauen der Probe schloss sich eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur an.
2. Die Probe wurde mit 200 µl Chloroform versetzt, das Tube 20 Mal von Hand geschwenkt.
3. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 12000 g und 4°C, wurde die wässrige, RNA-haltige Phase in ein neues, RNase- freies Tube überführt und anschließend mit 500 µl Isopropanol (2-Propanol) überschichtet, um die RNA zu fällen. Dieser Ansatz inkubierte für 10 Minuten bei Raumtemperatur und wurde erneut für 10 Minuten, bei 12000 g und 4°C zentrifugiert.
4. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das mit 1 ml 75%-igen Ethanol befüllt und 5 Minuten bei 7500 g und 4°C zentrifugiert. Dieser Schritt wiederholte sich ein weiteres Mal. Bei großen RNA-Mengen sollte ein Pellet zu sehen sein.
5. Um die verbliebenen Ethanolreste aus der Probe zu entfernen, wird diese für 10-20 Minuten bei 45°C im Heizblock getrocknet.
6. Zur Messung der RNA-Konzentration erfolgte die Aufnahme des Pellets in 25 µl nukleasefreies Wasser. Am Smart Spec 3000TM erfolgte die photometrische Konzenrationsmessung in einer 1:20 Verdünnung (Probe in Wasser).
7. Für den anschließenden Reverse-Transkriptase-Schritt (RT-Schritt) schloss eine fünfminütige Denaturierung der Proben die RNA-Präparation ab.

5.4.2 Reverse Transkriptase(RT)

Im RT-Schritt wurde die präparierte RNA unter Zuhilfenahme einer Reversen Transkriptase in komplementäre DNA – die so genannte cDNA – umgeschrieben. Es sind die größere Stabilität der cDNA einerseits und die Notwendigkeit der cDNA für die anschließende Polymerasekettenreaktion mit der Taq-Polymerase (PCR-polymerase chain reaction) andererseits, die den RT-Schritt indizieren.

Maximal 1,7 µg RNA/20 µl Ansatz konnten in cDNA umgeschrieben werden. Sollte diese Konzentration überschritten werden, ist eine Verdünnung der Probe mit RNase-freiem Wasser vorzunehmen. Um ein späteres Angleichen der eingesetzten Proben-cDNA aneinander gewährleisten zu können, wurde der Ansatz des RT-Schrittes auf lediglich 1 µg RNA/ 20 µl reduziert.

Das Ausgangsmaterial wird nun dem fort folgenden Reaktionsgemisch versetzt und anschließend bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Um eine Hydrolyse der Ausgangs-RNA zu unterbinden, wird der Ansatz durch einen Ribonukleaseinhibitor (RNAase out®) ergänzt.

Reaktionsgemisch = Master Mix für 20 µl Probe:

- 4,0 µl 10x RT Puffer
- 4,0 µl dNTP Mix (Nukleotide)
- 4,0 µl dT (Primer)
- 5,5 µl RNase – freies H₂O
- 2,0 µl RT – O (Omniscript)
- 0,5 µl RNase out

Die als cDNA vorliegende Probe kann nun bei -20°C bis zur Durchführung der PCR gelagert werden.

5.4.3 Quantitative real-time Polymerasekettenreaktion(qRT-PCR)

In dieser Arbeit kam die modernste Methode der Quantifizierung von Nukleinsäuren zum Einsatz: die quantitative Echtzeit-PCR. Die Zugabe eines Farbstoffes, der durch Interkalierung mit der DNA seine Fluoreszenz erhöht und damit messbar wurde, sowie die Einführung von Standards mit bekannter RNA-Konzentration erlaubte die Einordnung der unbekannten Proben in eine Standardkurve und eine anschließende Berechnung der Quantitäten.

Dieser Farbstoff, in diesem Falle SYBR®Green, band unspezifisch an das im PCR-Tube entstandene Produkt. Um zwischen dem korrekten Produkt oder aber einem unerwünschten Artefakt unterscheiden zu können, wurden Schmelzkurven der PCR-Produkte erstellt, die in

der Auswertung mit den Schmelzkurven der Standards verglichen wurden. Die Standardplasmide wurden in der Forschungsabteilung des Rudolf-Elle-Krankenhauses synthetisiert, getestet und etabliert. Abb. 25 zeigt die reinen Schmelzkurven der Standards, Abb. 26 hingegen die Schmelzkurven fälschlich vermehrter Produkte.

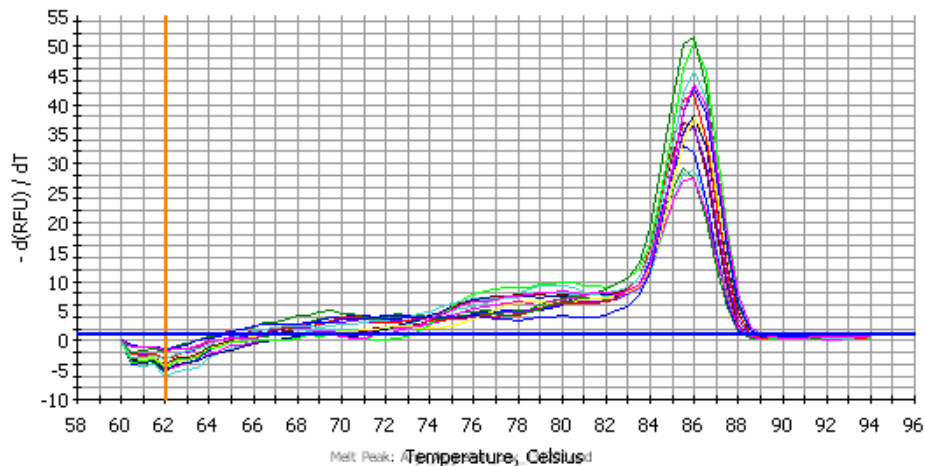


Abb. 25
Darstellung der Schmelzkurven der in der qrt-PCR verwendeten reinen Standards von Aggrekan. Mit diesen werden die Schmelzkurven der Proben verglichen, um eine Einschätzung über deren Reinheit vorzunehmen.

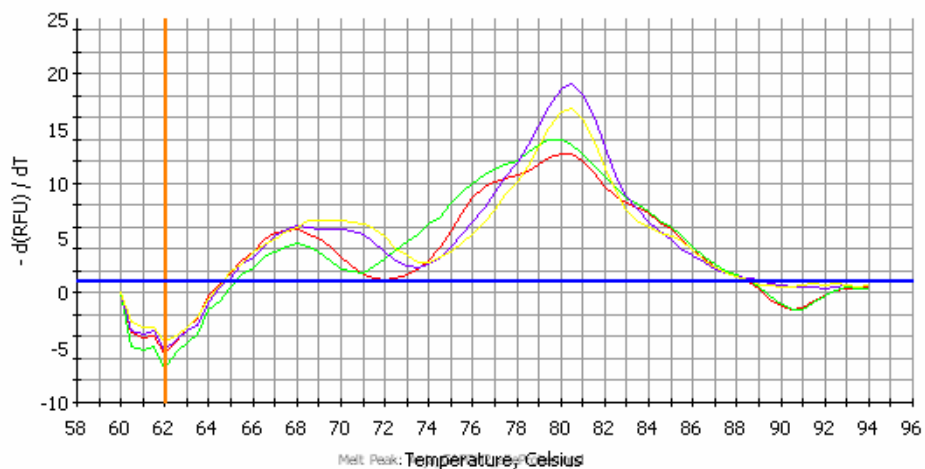


Abb. 26
Darstellung der Schmelzkurven unreiner Proben. Der Peak liegt bei 80°C, laut Standard ist dieser aber bei 86°C zu suchen.

Als Richtschnur für die Quantifizierung der Proben war die Ermittlung des C_T -Wertes (threshold-cycle-Wert) vonnöten: Jener entsprach der Zykluszahl, bei welcher sich das Fluoreszenzsignal erstmals deutlich vom Hintergrund differenzieren ließ. Dieser wurde mit den C_T -Werten bekannter Templatemengen verglichen, indem man eine Standardkurve erstellt (Abb.27).

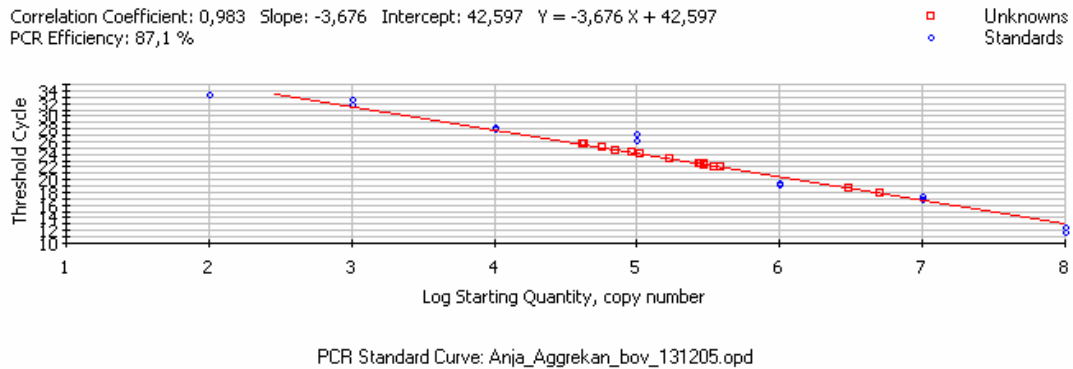


Abb. 27

Darstellung einer Aggrekan – Standardkurve. Blau dargestellt sind die bekannten Standards, rot die unbekannten Proben, deren Quantität nun ermittelt werden konnte.

Die Amplifikation der durch die Reverse Transkriptase gewonnene und mit nukleasefreiem Wasser 1:10 verdünnten cDNA erfolgte entsprechend dem nachstehenden Protokoll:

Template (Probe/Standard)	9,5 µl
----------------------------------	--------

Mastermix	$\Sigma = 10,5 \mu\text{l}$
SYBR®Green	10 µl
Upstream – Primer	0,3 µl
Downstream – Primer	0,3 µl

Es wurden die folgenden Primer benutzt:

Upstream Primer **GAPDH** 5' – CAT CAC TGC CAC CCA GAA GA – 3'

Downstream Primer **GAPDH** 5' – CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG – 3'

Upstream Primer **Aggrekan** 5' – ACT TCC GCT GGT CAG ATG GA – 3'

Downstream Primer **Aggrekan** 5' – TCT CGT GCC AGA TCA TCA CC – 3'

Upstream Primer **Col IIa1** 5' – CAT CTG GTT TGG AGA AAC CAT C – 3'

Downstream Primer **Col IIa1** 5' – GCC CAG TTC AGG TCT CTT AG -3'

Upstream Primer **Col Ia2** 5' – CTC AGA CCC AAG GAT TAT GAA G – 3'

Downstream Primer **Col Ia2** 5' – GGA TCC TTG CAG AAT GAC AG – 3'

Die qRT-PCR wurde am Multicolor Real-time Detection System nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Denaturieren bei 95°C: 2 min
- | | | | | |
|-------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---|-----------|
| • Denaturieren bei 94°C: 20 s | • Primerannealing bei 60°C: 20 s | • Polymerisation bei 72°C: 20 s | } | 40 Zyklen |
| | | | } | |
- Denaturieren bei 95°C: 1 min Kühlen auf 10°C

Während der Anlagerung der Primer an die DNA, sowie deren Polymerisierung erfolgten multiple Messungen der Fluoreszenzen.

5.4.4 Auswertung der qRT-PCR

Um die ermittelten Starting Quantities der mRNA-Expression einzelner Gene mit denen anderer Proben vergleichen zu können, wurde das Verhältnis der Starting Quantity der GAPDH - als Housekeeping (Haushalts-) Gen - und des gewünschten Gens (gene of interest) ermittelt. Es wurde somit der Anteil des *Gene of Interest* an der genetischen Aktivität der Zellen bestimmt.

5.5 Statistische Methode

Um eine Aussage über die statistische Signifikanz der erhobenen Messwerte zu erhalten, wurden sie mit dem (Student-) t-Test untersucht. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson (p) ist hierbei ein entscheidender Wert: Ist er kleiner als 0,05, so muss von statistisch signifikanten Ergebnis ausgegangen werden, d.h. dass Ergebnis ist mit einer 95%-igen Wahrscheinlichkeit nicht zufällig entstanden.

Die Berechnung der Statistik und anschließende Darstellung der Ergebniss erfolgte mit den Programmen SigmaStat 3.0 und SigmaPlot 9.0.

6. Ergebnisse

6.1 Vorversuch: Monolayerkultur

6.1.1 mRNA-Expression

Die Spongostan® versetzten Kulturen zeigten, verglichen mit den Kontrollkulturen, eine auf das 1,8-fache gesteigerte Kollagen Typ II – mRNA – Expression (Abb. 28). Die bestehende Differenz ist statistisch nicht signifikant – im T-test ($p=0,27$) – es lag hier somit lediglich ein Trend vor.

Im Vergleich zu den Kontrollkulturen zeigte sich in den Spongostan® haltigen Chondrozytenkulturen eine statistisch signifikante Reduktion ($p=0,002$ im T-Test) der Kollagen-Typ-I-Expression um das 280-fache (Abb. 29).

Ebenso sank das Verhältnis der mRNA-Expression von Kollagen Typ I zu Typ II bei den Monolayerkulturen (Abb. 30), deren Medium mit Spongostan versehen war, 2,4-fach unter das der Kontrollkulturen. Der T-Test wies mit ($p=0,005$) auf ein statistisch signifikantes Ergebnis hin.

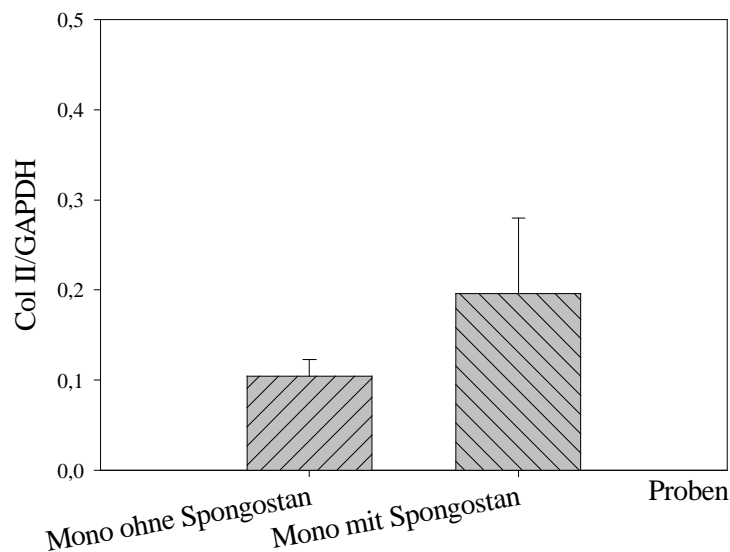


Abb. 28
mRNA-Expression von Kollagen Typ II normalisiert gegen die mRNA-Expression der GAPDH in Monolayerkulturen (2 Millionen primäre bovine Chondrozyten) ($n=8$) verglichen mit Monolayerkulturen (2 Millionen primäre bovine Chondrozyten), deren Medium mit 0,3 mg Spongostan®/ml versetzt wurde ($n=7$).

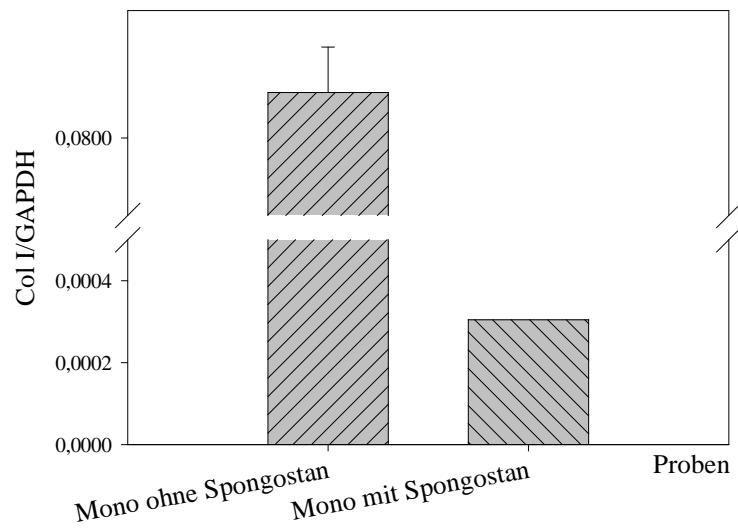


Abb. 29
mRNA-Expression von Kollagen Typ I normalisiert gegen die mRNA-Expression der GAPDH in Monolayerkulturen (2 Millionen primäre bovine Chondrozyten) (n=8) verglichen mit Monolayerkulturen (2 Millionen primäre bovine Chondrozyten), deren Medium mit 0,3 mg Spongostan®/ml versetzt wurde (n=8).

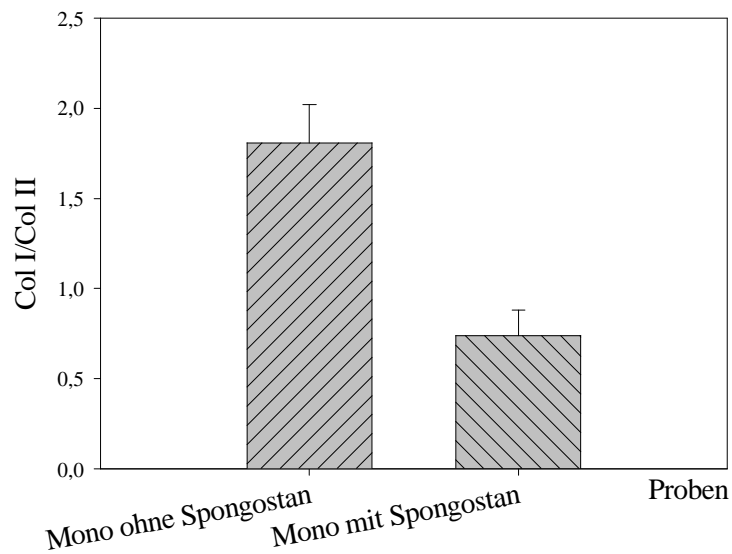


Abb. 30
Verhältnis der mRNA-Expression von Kollagen Typ I zur mRNA-Expression von Kollagen Typ II. Vergleich zwischen Monolayerkulturen (2 Millionen primäre bovine Chondrozyten) (n=8) und Monolayerkulturen (2 Millionen primäre bovine Chondrozyten), deren Medium mit 0,3 mg Spongostan®/ml versetzt wurde (n=7).

6.2 Die Kulturkammern

6.2.1 Allgemeine Betrachtungen

Bereits wenige Minuten nach Verschließen der Kulturkammer begann die Spongostan-Chondrozyten-Masse, sich zu verfestigen und eine runde Form anzunehmen. Öffneten sich Kulturkammern kurze Zeit nach dem Verschließen wegen des zu groß werdenden hydrostatischen Drucks im Inneren, blieb die plastiline Masse ebenfalls über etwa 14 Tage stabil und membranverhaftet. Nach 28 Tagen jedoch war die Masse durch den häufigen Mediumwechsel erweicht und zerfiel beim Herausnehmen aus der Wellplatte.

Konstrukte, deren Minusheets über den Zeitraum ihrer Kultivierung verschlossen geblieben waren, zeigten eine einheitliche Membranverankerung, wie in Abb. 31 präsentiert.

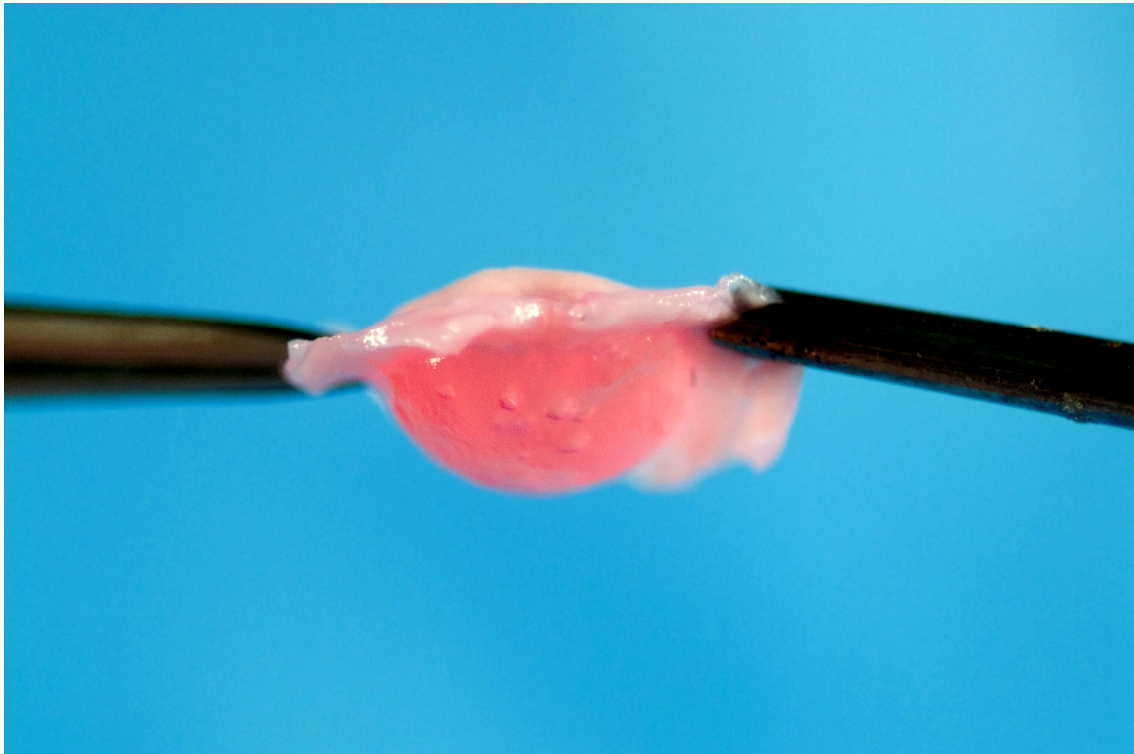


Abb. 31

Das Ergebnis eines siebentägigen Experimentes: Nach Öffnen der Kulturkammer und Entfernen der Dialysemembran zeigte sich eine fest an der Kollagenmembran verankerten Chondrozyten - Spongostan - Masse, die auch nach zehnmütigen Haltens zwischen zwei Pinzetten nicht nach unten stürzte.

Die Entwicklung der Chondrozytenkerne vom sphärischen Phänotyp nach 7-tägiger Kultivierung hin zum fibroblastoid wirkenden, lang gestreckten Kern nach 28-tägiger Kultur war in allen histologischen Präparaten zu beobachten. Abb. 32 und 33 zeigt den Vergleich zwischen DAPI-gefärbter Zellkernen nach 7-tägiger und 28-tägiger Kultur. Beide abgebildeten Präparate wurden in 40-facher Vergrößerung fotografiert, zeigen jedoch deutliche Längendifferenzen: 2µm nach 7-tägiger Kultivierung, 10µm nach 28-tägiger.

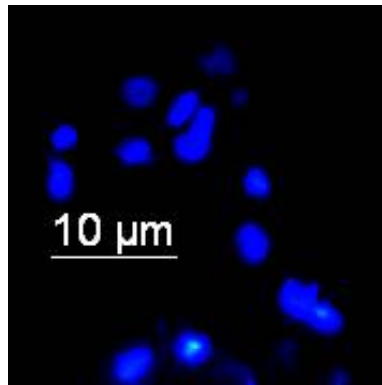


Abb. 32
Runde, etwa 1-2 µm messende Chondrozytenkerne nach 7-tägiger Kultur, Färbung mit DAPI, 40-fache Vergrößerung

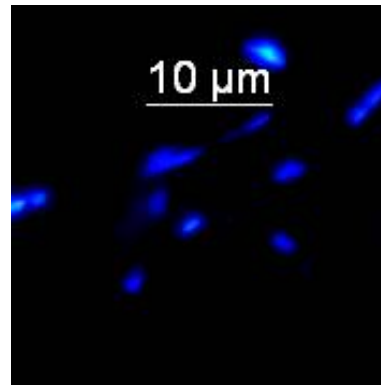


Abb. 33
Langgestreckte, bis 10 µm messende Knorpelzellkerne in einem 28-tägigen Experiment, Färbung mit DAPI, 40-fache Vergrößerung

6.2.2 Kultivierung der Kammern für sieben Tage

6.2.2.1 Histologie

In allen für sieben Tagen kultivierten Kammern waren immunhistologisch Kollagen Typ II, Aggrecan und Pro-Kollagen Typ I im gesamten Präparat nachweisbar.

Während sich das Pro-Kollagen Typ I sowohl in der Übersichts- wie auch in der Detailvergrößerung teilweise sehr diffus darstellt (Abb. 40, 41), war eine strenge perizelluläre Verteilung des Aggrecan (Abb. 36, 37) und vor allem des Typ-II-Kollagen (Abb. 34, 35) zu beobachten. Die Differenzierungsmarker zeigten in der 10-fachen Vergrößerung zusätzlich Regionen stärkerer Expression, welche jedoch keiner größeren Kerndichte zuzuordnen war, sondern am ehesten stoffwechselaktiveren Chondrozyten entspricht.

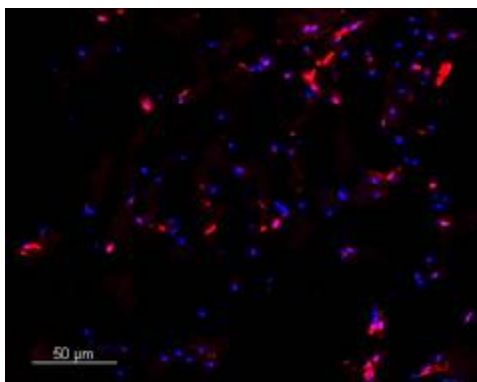


Abb. 34
Doppelbelichtete Übersichtsaufnahme einer 7-tägigen Kultur. Ubiquitäre Kollagen-Typ-II-Expression (rot). 10-fache Vergrößerung

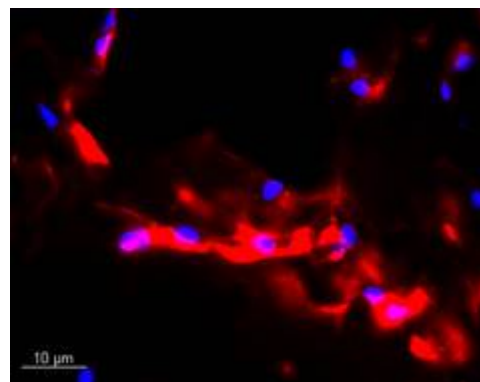


Abb. 35
Doppelbelichtung einer 7-Tages-Kultur. Starke perizelluläre Kollagen-Typ-II-Expression. 40-fache Vergrößerung

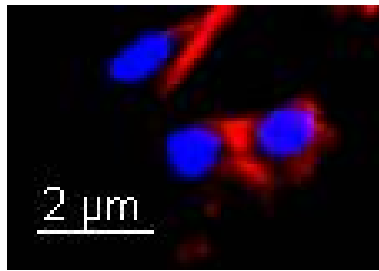


Abb. 36
Doppelbelichteter Ausschnitt aus einer 7-Tages-Kultur. Rot = Kollagen Typ II, blau = DAPI gefärbter Zellkern. Deutlich perizelluläre Expression des Kollagens.
40-fache Vergrößerung

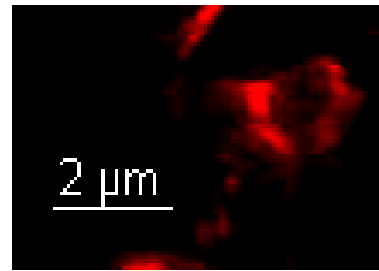


Abb. 37
Das gleiche Präparat wie links, jedoch rot belichtet, welches lediglich die Kollagen-Typ-II-Expression zeigt. Deutlich zu sehen, der Schatten des nicht fotografierten Kern.
40-fache Vergrößerung

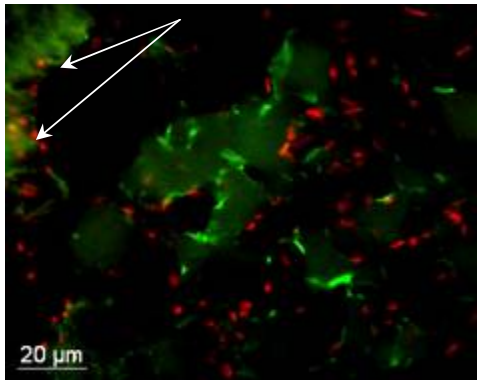


Abb. 38
Doppelbelichtung einer 7-Tages-Kultur. Die Aggrekanexpression stellt sich grün dar, während sich die Zellkerne rot präsentieren. Am linken Bildrand (Pfeile) ist die Kollagenmembran zu sehen, in die Chondrozyten eingewandert sind. Die Aggrekan findet sich ubiquitär, jedoch differiert die Intensität.
20-fache Vergrößerung

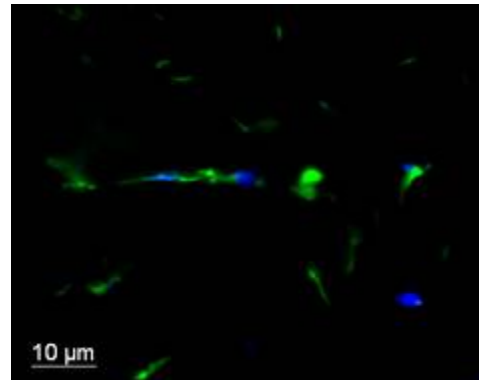


Abb. 39
Doppelbelichteter Ausschnitt einer 7-Tages-Kultur: Aggrekan grün, Chondrozytenkerne mit DAPI blau gefärbt. Die Länge der perizellulären Proteoglykanaggregate wird im Größenvergleich mit dem Zellkern deutlich.
40-fache Vergrößerung

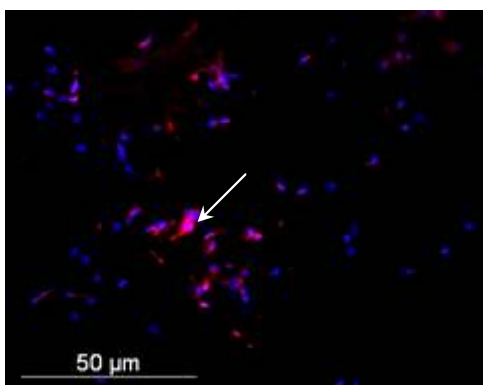


Abb. 40
Diffuse, teilweise perizelluläre (Pfeil), Pro-Kollagen-Typ-I-Expression in einer 7-Tages-Kultur.
20-fache Vergrößerung

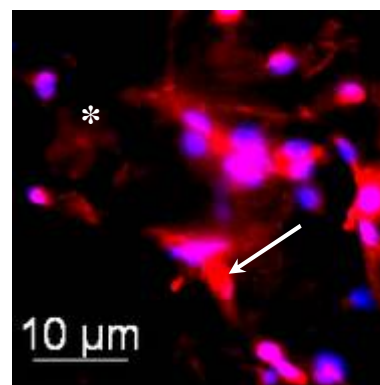


Abb. 41
Detail des nebenstehenden Präparats. Kräftige perizelluläre Expression (Pfeil) neben diffuser zellferner (*).
40-fache Vergrößerung

6.2.2.2 mRNA-Expression

Im Vergleich zur Monolayerkultur erschien die mRNA-Expression des Typ-II-Kollagen in den für sieben Tagen kultivierten Kammern um das 3,5-fache gesteigert (Abb. 42). Bei ($p=0,18$) im T-Test liegt jedoch lediglich ein Trend vor.

Dieser bestätigte sich wiederum bei der mRNA-Expression von Aggrekan (Abb. 43), welche in den Kulturkammern 1,4-fach höher erschien als in den Monolayerkulturen ($p=0,43$).

Statistisch signifikant stellte sich die Differenz der mRNA-Expression des Dedifferenzierungsmerkmals Kollagen Typ I der beiden Vergleichsgruppen dar (Abb. 44): In den Kulturkammern war die mRNA-Expression des Typ-I-Kollagens etwa 7,5-fach geringer als in den Monolayerkulturen ($p = 4,4 \cdot 10^{-6}$ im T-Test).

Entsprechend zeigte auch das Verhältnis von Kollagen Typ I zum Typ-II-Kollagen in den Kulturkammern eine fast 42-fache, statistisch signifikante ($p=2,3 \cdot 10^{-5}$) Reduktion gegenüber den Monolayerkulturen (Abb. 45).

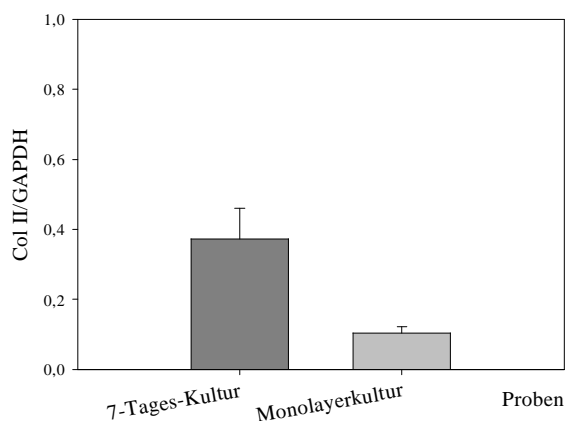


Abb. 42
mRNA-Expression von Kollagen Typ II normalisiert gegen GAPDH der 7-Tages-Kulturen ($n=12$), Monolayerkultur als Kontrolle ($n=4$)

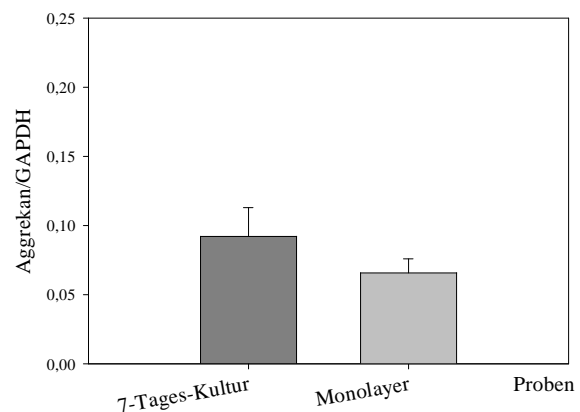


Abb. 43
mRNA-Expression von Aggrekan normalisiert gegen GAPDH der 7-Tages-Kulturen ($n=9$), Monolayerkultur als Kontrolle ($n=4$)

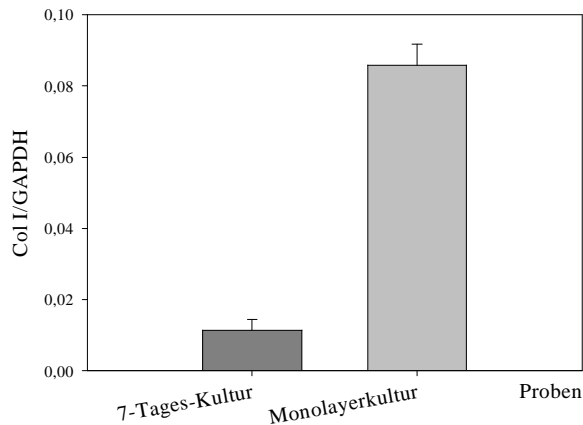


Abb. 44
mRNA-Expression von Kollagen Typ I normalisiert gegen GAPDH der 7-Tages-Kulturen (n=12), Monolayerkultur als Kontrolle (n=4)

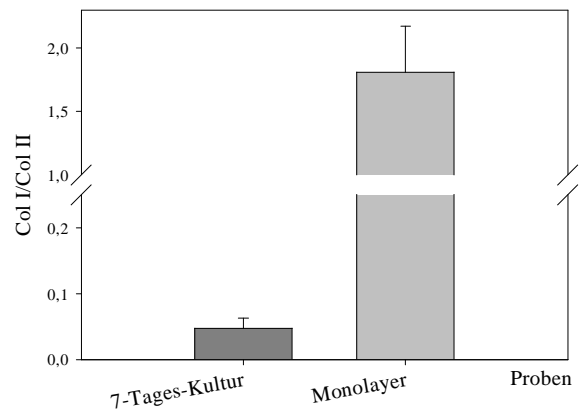


Abb. 45
mRNA-Expression von Kollagen Typ I normalisiert gegen Kollagen Typ II der 7-Tages-Kulturen (n=12), Monolayerkultur als Kontrolle (n=4)

6.2.3 Kultivierung der Kammern für 14 Tage

6.2.3.1 Histologie

Immunhistologisch konnte die Anwesenheit von Typ-II-Kollagen, Aggrekan und Pro-Kollagen Typ I in den für 14 Tage kultivierten Kammern nachgewiesen werden.

Wiederum zeigte sich die Expression von Kollagen Typ II und Aggrekan (Abb. 46, 47, 48, 49 u. 50) perizellulär. Das Fluoreszenzsignal vor allem von Aggrekan erschien im Vergleich mit den Sieben-Tages-Kulturen intensiver und großzügiger über das Präparat verteilt. Abb. 48 gab Aufschluss über die bis einige Tausend nm betragende Größe des Aggrekanmoleküle.

Die Pro-Kollagen-Typ-I-Expression erschien diffus und zellfern verteilt (Abb. 51, 52) in geringerer Intensität als in den siebentägigen Kulturen.

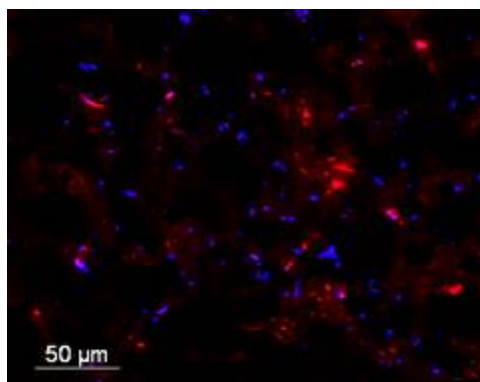


Abb. 46
Doppelbelichtung einer 14-Tages-Kultur. Das Typ-II-Kollagen (rot) zeigt sich perizellulär.
10-fache Vergrößerung

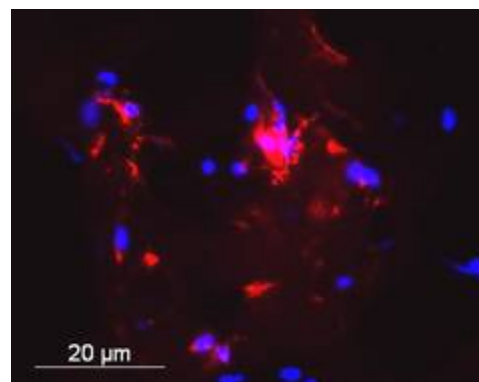


Abb. 47
Doppelbelichtung einer 14-Tages-Kultur. Das Typ-II-Kollagen zeigt sich perizellulär.
40-fache Vergrößerung

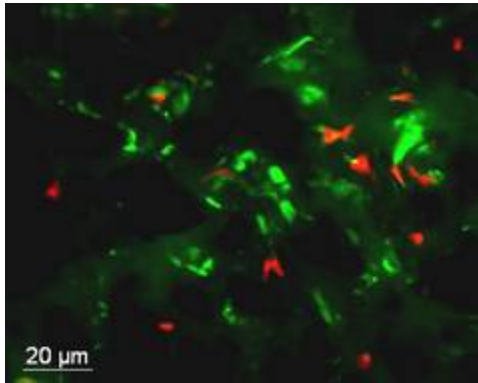


Abb. 48

Zeigt die Zunahme sowohl in Größe, wie auch Ubiquität der Aggrekanexpression (grün) in einer 14-Tages-Kultur im Vergleich zur oben gezeigten Übersichtsaufnahme.

20-fache Vergrößerung

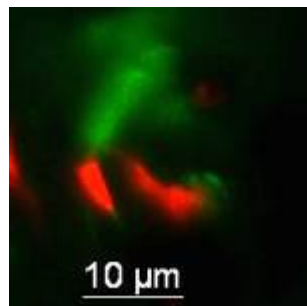


Abb. 49

Vergrößerter Ausschnitt einer doppelt belichteten 14-Tages-Kultur, welcher die Größe ($>10\mu\text{m}$) und Perizellularität der Aggrekanexpression beweist.

40-fache Vergrößerung

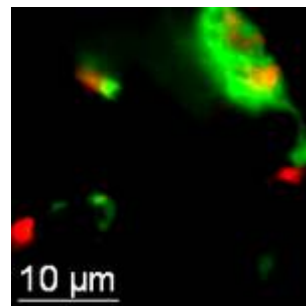


Abb. 50

Darstellung eines Aggrekanfeldes mit darin liegenden Chondrozyten in einer 14-Tages-Kultur (Pfeil): Das Expressionsmuster gleicht einer Mauer um die Zellen.

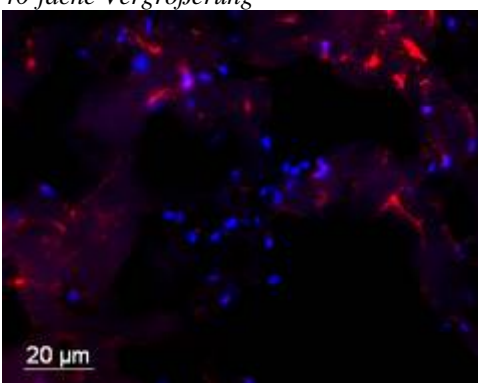


Abb. 51

Die Intensität der Pro-Kollagen-Typ-I-Expression in dieser 14-Tages-Kultur ist geringer als in der 7-tägigen Kultur, erscheint ebenfalls diffus und zellfern.

20-fache Vergrößerung

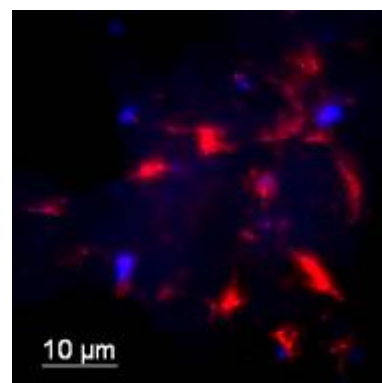


Abb. 52

Detailvergrößerung des nebenstehenden Präparats. Kräftige, aber zellferne Expression, selten perizelluläre Verteilung (Pfeil).

40-fache Vergrößerung

6.2.3.2 mRNA-Expression

Nach 14 Tagen Kultivierung zeigten die Zellen in den Kulturkammern eine 3,8-fach gesteigerte mRNA-Expression des Kollagen Typ II im Vergleich zu den Monolayerkulturen (Abb. 53). Bei ($p=0,13$) im T-Test lag auch hier nur ein Trend vor. Dieser zeigte sich ebenfalls bei der mRNA-Expression von Aggrekan (Abb. 54): Das Verhältnis von Aggrekan zur GAPDH war in den Kulturkammern fast 1,5-fach höher als jenes in der Monolayerkultur ($p=0,19$).

Eine deutlichere Reduktion zeigte sich beim der Kollagen-Typ-I-Expression (Abb. 55): Diese war gegenüber den zweidimensional wachsenden Zellen der Monolayerkultur in den Kulturkammern statistisch signifikant dreifach erniedrigt ($p=0,002$). Folglich präsentierte sich das Verhältnis Typ-I- zu Typ-II-Kollagen (Abb. 56) ähnlich. Die Zellen in den Kulturkammern zeigten eine 26-fach geringeres Verhältnis der mRNA-Expression von Kollagen Typ I zu Typ II.

Die Untersuchung der mRNA-Expression von Aggrekan in den Kulturkammern ergab ein weiteres interessantes Ergebnis. Blieben die Minusheets über die 14-tägige Kultivation geschlossen, war die mRNA-Expression des Aggrekan zweifach höher als in den versehentlich offen kultivierten Kammern (Abb. 57). Im gepaarten T-Test zeigt sich mit ($p=0,046$) eine statistisch signifikante Steigerung.

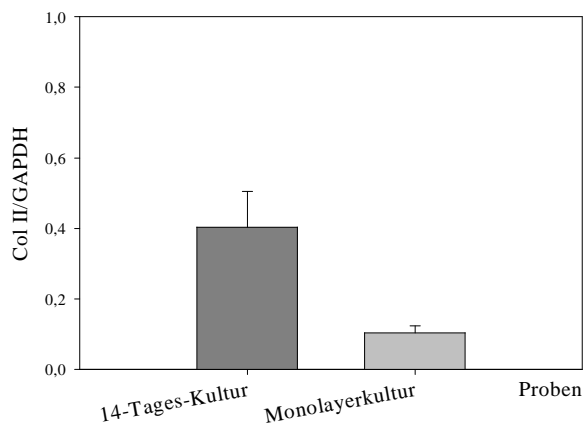


Abb. 53
mRNA-Expression von Kollagen Typ II normalisiert gegen GAPDH der 14-Tages-Kulturen ($n=10$), Monolayerkultur als Kontrolle ($n=4$)

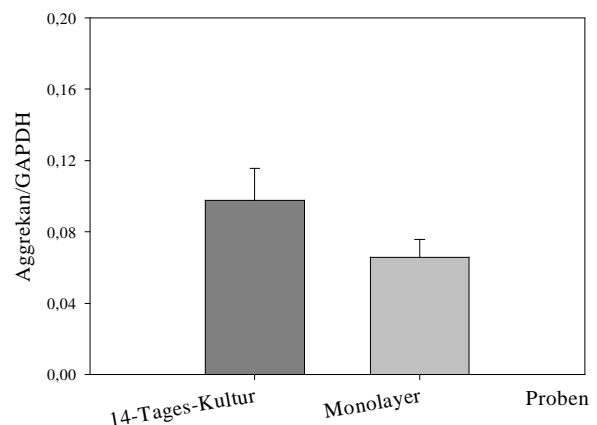


Abb. 54
mRNA-Expression von Aggrekan normalisiert gegen GAPDH der 14-Tages-Kulturen ($n=10$), Monolayerkultur als Kontrolle ($n=4$)

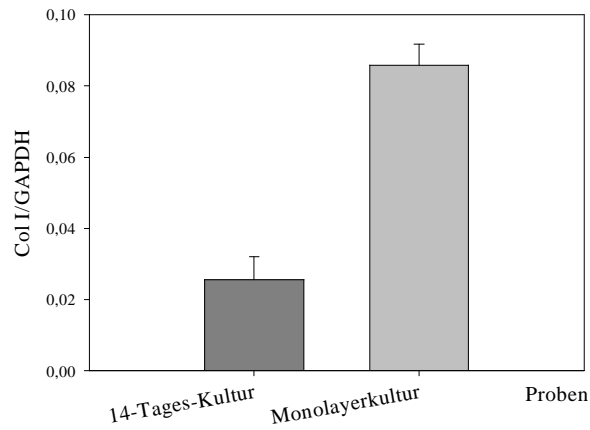


Abb. 55
mRNA-Expression von Kollagen Typ I normalisiert gegen GAPDH der 14-Tages-Kulturen (n=10), Monolayerkultur als Kontrolle (n=4)

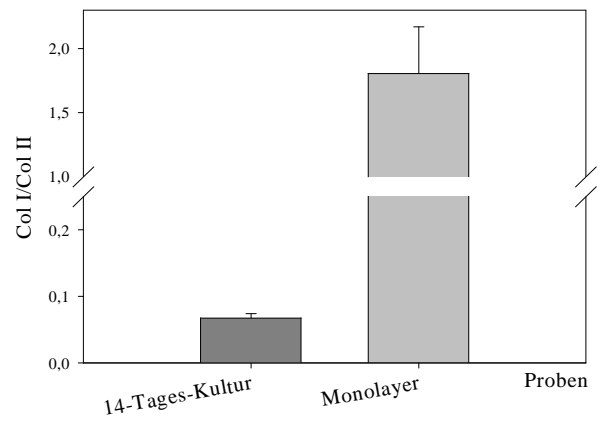


Abb. 56
mRNA-Expression von Kollagen Typ I normalisiert gegen Kollagen Typ II der 14-Tages-Kulturen (n=10), Monolayerkultur als Kontrolle (n=4)

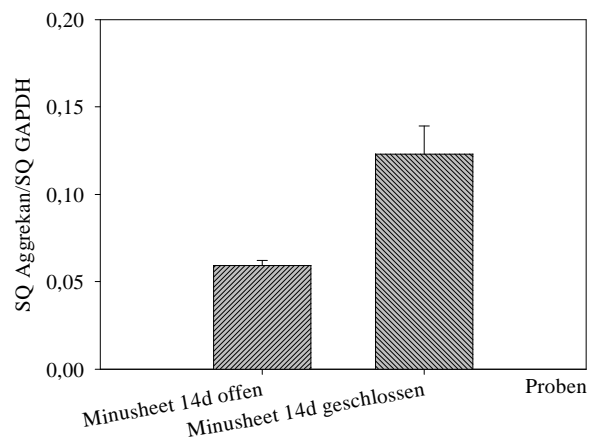


Abb. 57
Aggrecan-mRNA-Expression eines geschlossen kultivierten Minusheets (n=6) verglichen mit einem offen kultivierten (n=4). Die mRNA-Expression von Aggrecan ist in der geschlossenen Kulturkammer statistisch signifikant höher als in der offenen Kultur (p=0,04).

6.2.4 Kultivierung für 28 Tage

6.2.4.1 Histologie

Nach 28-tägiger Kultivierung zeigten die Zellen in den Minusheets® eine deutlich geringere Kollagen-Typ-II- und Aggrekanexpression als in den ersten beiden Kultivationswochen (Abb. 58, 59 und 60). Die großflächige Verteilung der Antigene war in den Präparaten größtenteils verschwunden. Die Perizellulärität hingegen blieb, vor allem bei Aggrekan (Abb. 61, 62), erhalten.

Eine Intensitätssteigerung wurde bei der Pro-Kollagen-Typ-I-Expression ersichtlich (Abb. 63): Das Fluoreszenzsignal war auch hier perizellulär zu finden, schien aber entlang den Hohlräumen des schwammähnlichen Spongostans® intensiver zu werden (Abb. 64).

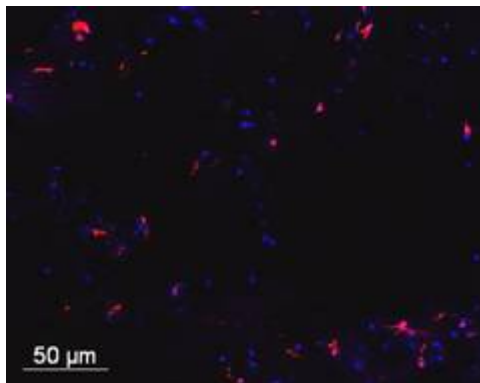


Abb. 58
Übersichtsdarstellung einer 28-tägigen Kultur. Deutlich schwächer erscheint die Kollagen-Typ-II-Expression
10-fache Vergrößerung

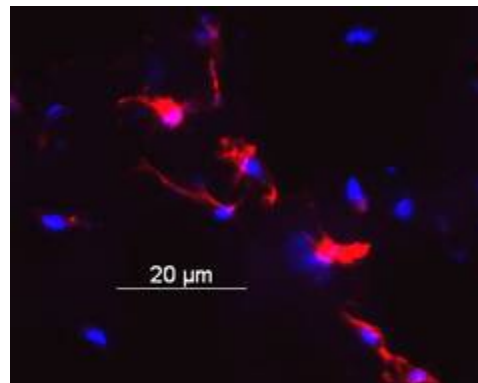


Abb. 59
Doppelbelichtung einer 28-Tages-Kultur. Die Intensität des Kollagen Typ II ist geringer als in den oben gezeigten Bildern.
40-fache Vergrößerung

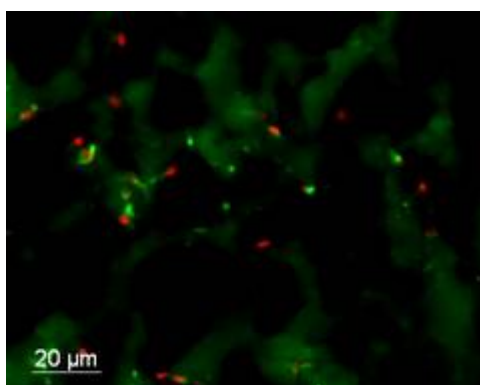


Abb. 60
Doppelbelichtung einer 28-tägigen Kultur zeigt die Aggrekanexpression, die im Vergleich mit beiden oben präsentierten Übersichtsaufnahmen deutlich abgenommen hat.
20-fache Vergrößerung

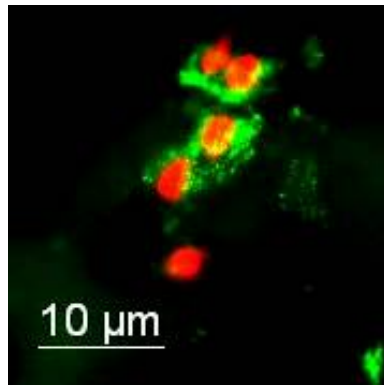


Abb. 61
Detailvergrößerung aus einer 28-Tages-Kultur, die die perizelluläre Expression von Aggrecan verdeutlicht.
40-fache Vergrößerung

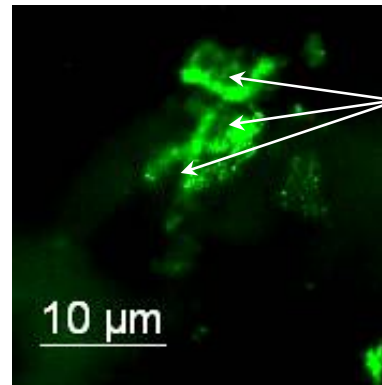


Abb. 62
Gleiche Abb. wie links, ohne Belichtung der roten Chondrozytenkerne. Auch hier sind die Schatten der Zellkerne (Pfeile) in der Aggrecanexpression zu sehen.
40-fache Vergrößerung

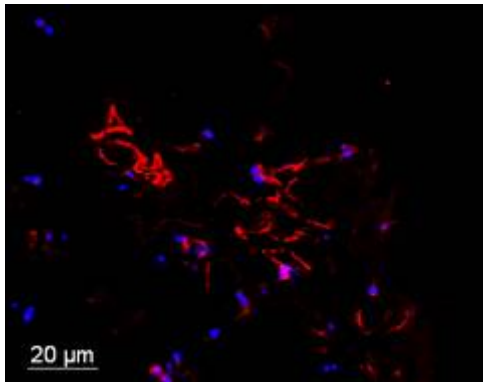


Abb. 63
Kräftige Pro-Kollagen-Typ-I-Expression in einer 28-tägigen Kultur.
20-fache Vergrößerung

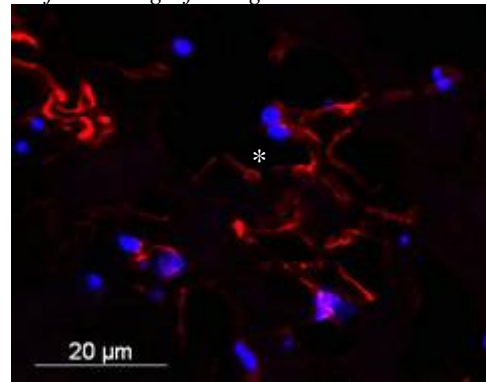


Abb. 64
Vergrößerte Aufnahme des nebenstehenden Präparats. (*) kennzeichnet einen Hohlraum im Spongostan, an dessen Begrenzung das Pro-Kollagen Typ I kräftig exprimiert ist.
40-fache Vergrößerung

6.2.4.2 mRNA-Expression

Sowohl die mRNA-Expression von Typ-II-Kollagen wie auch die des Aggrecan sank im Mittelwert deutlich, etwa um das zweifache, unter die Kontrolle ab (Abb. 65 und 66). Der T-Test bestätigte diese Reduktion als Trend ($p=0,23$ in beiden Fällen).

Die mRNA-Expression von Kollagen Typ I in den Kulturkammern blieb etwa dreifach geringer als jene in den Monolayerkulturen (Abb. 67), zeigte jedoch keine statistische Signifikanz ($p=0,09$). Statistisch nicht signifikant blieb das Verhältnis der mRNA-Expression von Kollagen Typ I zu Typ II in den Kulturkammern etwa 1,7-fach geringer als jenes in den Monolayerkulturen (Abb. 68).

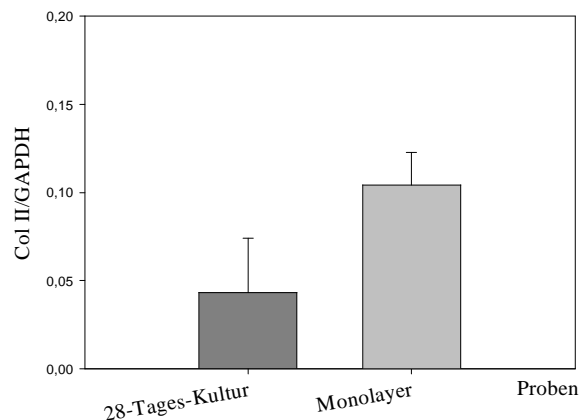


Abb. 65
mRNA-Expression von Kollagen Typ II normalisiert gegen GAPDH der 28-Tages-Kulturen (n=4), Monolayerkultur als Kontrolle (n=4)

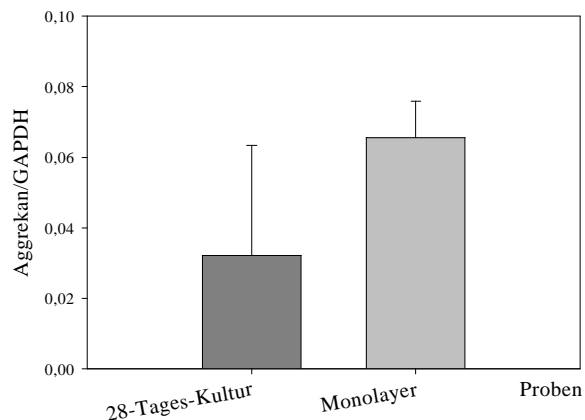


Abb. 66
mRNA-Expression von Aggrecan normalisiert gegen GAPDH der 28-Tages-Kulturen (n=4), Monolayerkultur als Kontrolle (n=4)

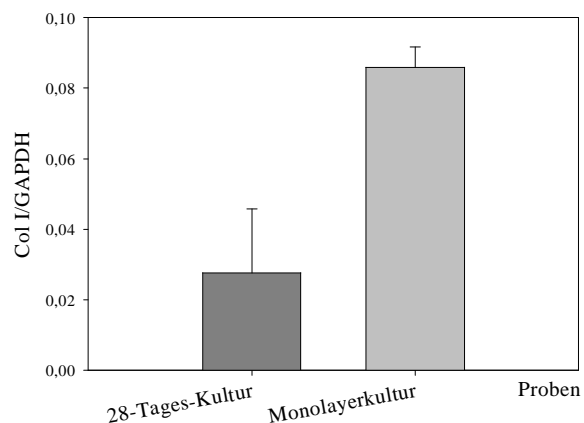


Abb. 67
mRNA-Expression von Kollagen Typ I normalisiert gegen GAPDH der 28-Tages-Kulturen (n=4), Monolayerkultur als Kontrolle (n=4)

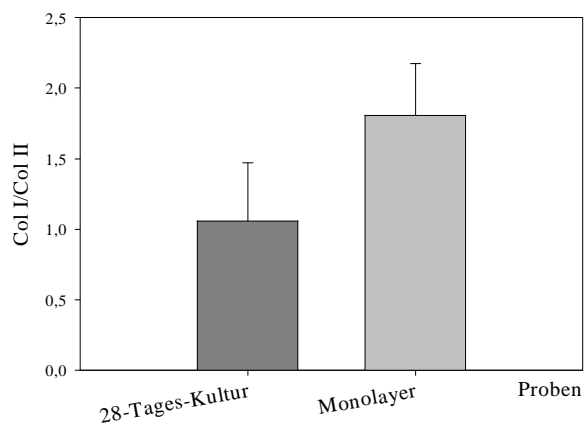


Abb. 68
mRNA-Expression von Kollagen Typ I normalisiert gegen Kollagen Typ II der 28-Tages-Kulturen (n=4), Monolayerkultur als Kontrolle (n=4)

6.3 Biochemische Charakterisierung

Nach 14-tägiger Kultivierung erreichte die Glykosaminoglykankonzentration in den Minushefts ein Maximum mit durchschnittlich 0,21 µg/mg kultiviertem Material (Spongostan, Chondrozyten, BioGide-Membran). Damit stieg die GAG-Konzentration in der zweiten Kulturwoche statistisch signifikant um das Dreifache. Nach Erreichen des Maximums sank die GAG-Konzentration im folgenden Kultivationszeitraum auf 0,065 µg/mg Kulturmasse nach 28 Kulturtagen ab. Diese Reduktion um Dreifache war mit ($p=0,7 \cdot 10^{-5}$) statistisch signifikant (Abb. 69).

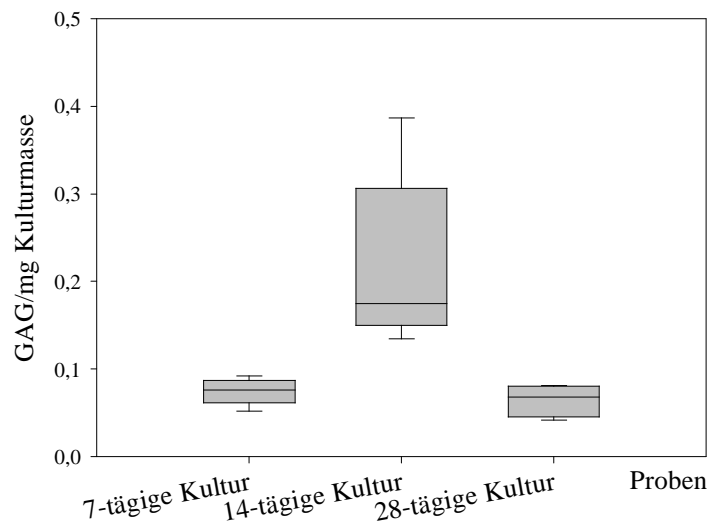


Abb. 69
Glykosaminoglykankonzentration pro mg kultivierter Masse in den Minushefts. Durchschnittlicher Maximalwert nach 14 Tagen Kultivierung bei 0,21 µg/mg (n=17); nach 7 Tagen: 0,07 µg/mg (n=12); nach 28 Tagen: 0,06 µg/mg (n=12)

7. Diskussion

In dieser Arbeit wurde erstmalig die Entwicklung und molekulare Charakterisierung eines plastischen membranverankerten Chondrozytenimplantats auf der Basis des Hämostyptikums Spongostan® vorgestellt.

Der Vergleich mit anderen Material untersuchenden Studien barg einige Schwierigkeiten in sich: Es differieren nicht nur die Materialeigenschaften, sondern auch die Kultivierungsbedingungen und nicht zuletzt die eingesetzten Zelltypen. So können in diesem Teil der Arbeit nur wenige Veröffentlichungen zum Vergleich der Ergebnisse herangezogen werden.

Da die Kombination des Gelatine basierten Spongostan® mit Chondrozyten in der Literatur einmalig in einer Kurzpublikation von Goodstone und Mitarbeitern (2004) beschrieben wurde, begann die experimentelle Phase mit Monolayerkulturen, die Aufschluss über die Verträglichkeit des Trägers geben sollten. In diesen 2D-Kulturen ist der Verlust der chondrozytären Charakteristika zu erwarten. Es wandelte sich der sphärische Phänotyp einerseits in einen spindelförmig, fibroblastoiden (Benya und Shaffer 1982) und andererseits wurde die mRNA-Expression von Kollagen Typ II reprimiert, die des Typ-I-Kollagens induziert (Kaps et al. 2004).

Phänotypisch zeigten die in Spongostan® haltigem Medium kultivierten Chondrozyten keine Einschränkung der Vitalität. Die erwartete Dedifferenzierung der Chondrozyten in der Monolayerkulturen vollzog sich in den Spongostan®-Kulturen optisch langsamer als in den Kontrollkulturen: Die Chondrozyten erhielten erst einige Tage später das spindelförmige Aussehen, adhärirten später am Flaschenboden als die Zellen der Spongostan® freien Kulturen.

Die qRT-PCR spiegelte diesen positiven, die Dedifferenzierung der Chondrozyten verzögerten Effekt wider: Die mRNA-Expression von Kollagen Typ II war nach 14 Tagen in den Spongostan®-Kulturen um 87% höher als in den Kontrollen ($p = 0,27$). Das in der Proliferationsphase von Chondrozyten induzierte Kollagen Typ I zeigte eine statistisch signifikante Erniedrigung ($p = 0,002$) in den Spongostan® haltigen Kulturen.

Eine mögliche Fehlerquelle - nämlich das Auswaschen von an Spongostan® gebundenen Chondrozyten während des Mediumwechsels - wurde durch die Verwendung von 750 ml Kulturflaschen ausgeschlossen. Ein Mediumwechsel war während der 14-tägigen Kultivierung nicht notwendig.

Dieser Vorversuch bewies die fehlende Toxizität des Spongostan® und erlaubte die Hypothese, dass dieses die Dedifferenzierung von Chondrozyten in Monolayerkulturen verzögert.

Spongostan® erfüllte damit die von Gaissmaier et al. (2003a) und Perka (1999) geforderte Stabilisierung des chondrozytären Phänotyps.

Zur Herstellung der Chondrozytenimplantate wurden primäre bovine Knorpelzellen aus dem Knie verwendet. Die Hypothese von Yates und Mitarbeitern (2005), Knorpelzellen seien Vorgängerzellen wie mesenchymalen Stammzellen, Zellen aus Periost oder Perichondrium im Tissue Engineering von Gelenkknorpel überlegen, weil in ihnen das angemessene genetische Programm bereits vollständig aktiviert sei, unterstützte die Wahl des Zelltypes. Auf die Expansion der Chondrozyten wurde verzichtet, um die Dedifferenzierung in der 2-dimensionalen Kultur und damit den Verlust knorpeltypischer Merkmale wie Kollagen Typ II und Aggrekan (Horwitz und Dorfman 1970, Hering et al. 1994), zu umgehen.

Die Analyse der Chondrozytenimplantate erfolgte immunhistologisch, molekulargenetisch und biochemisch.

In der immunhistochemischen Auswertung waren der Differenzierungsmarker Kollagen Typ II (Kaps et al. 2004) unabhängig von der Kultivationszeit in allen Präparaten nachweisbar. Die Intensität schwankte jedoch: In der Mehrzahl der siebentägigen Kulturen war das Typ-II-Kollagen ubiquitär und zellnah zu erkennen. Nach einer weiteren Woche in Kultur erschien die Verteilung im Gesamtpräparat zwar größer, die Intensität des perizellulären Signals jedoch geringer. Nach 28 Tagen fehlte das über das gesamte Präparat verteilte Signal zum größten Teil. Es waren nur noch einzelne perizelluläre Expressionen von Kollagen Typ II zu finden.

Die Expression von Aggrekan stieg in den ersten beiden Kulturwochen an, zeigte nach 14 Tagen ein Maximum. Nach 28 Tagen war ähnlich wie bei der Kollagen-Typ-II-Expression auch die Intensität des Aggrekansignals deutlich niedriger als während der ersten beiden Kultivationswochen. In allen histologischen Schaubildern ist die Größe des Aggrekanmolküls (mehrere tausend nm) (Martinek 2003) und die perizelluläre Verteilung des Proteoglykans ersichtlich.

Der Dedifferenzierungsmarker Kollagen Typ I (Kaps et al. 2004), in dieser Arbeit mit Hilfe des Vorgängermoleküls Pro-Kollagen Typ I dargestellt, zeigte deutliche Intensitätsunterschiede in Abhängigkeit von der Kultivationsdauer. Während das Signal nach 7-tägiger Kultur diffus und perizellulär zu orten war, ließ sich nach 14 Tagen eine schwächere Ausprägung im Präparat mit mangelnder Perizellularität erkennen. Nach 28 Tagen hingegen war eine deutli-

che Intensitätssteigerung zu verzeichnen: Auffällig ist das Verteilungsmuster der Pro-Kollagen Typ I, welches der Hohlraumstruktur des Spongostan® zu folgen scheint.

Die immunhistologischen Untersuchungen gaben nicht nur Aufschluss über die Extrazellulärmatrix, sondern auch über die Verteilung und den Phänotyp der Chondrozytenkerne. Im Spongostan® war eine homogene Besiedelung mit Knorpelzellen nachweisbar. Selten waren Cluster von bis zu sieben Zellkernen zu finden. Der sphärische Phänotyp wandelte sich mit zunehmender Kultivationsdauer: In einigen 28-tägigen Kulturen waren die Zellkerne deutlich gestreckter als in den für ein oder zwei Wochen kultivierten Kammern. Ähnlich wie in den zum Vergleich herangezogenen Studien war es auch in dieser Arbeit nicht gelungen, die für den hyalinen Knorpel typische zonale Gliederung und Arkadenstruktur der Kollagenfibrillen wiederherzustellen.

In der Literatur fanden sich häufig lediglich die immunhistologische Darstellung des Typ-II-Kollagens: So sprachen Kaps und Mitarbeiter (Kaps et al. 2004), die resorbierbare Polymervliese mit passagierten humanen Chondrozyten besiedelten, ebenfalls von einer homogenen und perizellulären Expression des Differenzierungsmarkers.

Stark et al. (2006) verwiesen in ihrer Arbeit mit Kollagenmatrices auf eine positive Kollagen-Typ-II-Immunhistologie, die die Produktion eines chondrozytären Kollagen indizierte.

Zusammenfassend lässt die immunhistologische Auswertung folgende Aussagen zu: Die Differenzierungsmarker Aggrekan und Kollagen Typ II zeigen nach 14 Tagen Kultivierung ein Intensitätsmaximum, während sich der Dedifferenzierungsmarker Kollagen Typ I auf einem Minimum befindet. Aus dieser Sicht stellen 14 Tage das Optimum der Kulturdauer dar.

Während auch neuere Publikationene nur den qualitativen oder semiquantitativen Nachweis einer spezifischen mRNA-Expression präsentierten (Goodstone et al. 2004, Stark et al. 2006), wurde in dieser Arbeit eine Quantifizierung der mRNA-Expression mit der Realtime-PCR vorgenommen. Lediglich Kaps und Mitarbeiter nutzten in ihrer Studie dasselbe Prinzip (2004) und so konnte diese Publikation als Vergleich dienen.

Als Kontrollgruppe für die Ergebnisse diente eine für 14 Tage kultivierte 2D-Aussaat boviner Chondrozyten. Die Monolayerkultur wurde als Referenz herangezogen, weil sie als Teil der ACT als empfohlene Behandlungsmethode großer Knorpeldefekte gilt (Gaissmaier et al. 2003b).

Während der Kultivation der Chondrozyten in den Minusheets stieg die mRNA-Expression des Typ-II-Kollagen in den ersten beiden Wochen an, lag im Durchschnitt etwa 70% über der Kontrollgruppe. In den folgenden beiden Kultivationswochen fiel das Differenzierungsmerk-

mal etwa um das Zweifache gegenüber der Kontrolle ab. Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied, sondern ein Trend.

Die mRNA-Expression des Proteoglykans Aggrekan zeigte einen ähnlichen Verlauf wie das Kollagen Typ II: Während der ersten beiden Kultivationswochen stieg die Aggrekan-mRNA-Expression an, um in der dritten und vierten Woche unter das Niveau der Kontrolle zu sinken. Auch hier bestand kein statistisch signifikanter Unterschied im Expressionsniveau.

Chondrozyten, die in verschlossenen Minusheets kultiviert wurden, exprimierten signifikant mehr Aggrekan-mRNA als Knorpelzellen, deren Minusheets während der 14-tägigen Kultivation offen geblieben waren ($p = 0,04$). Diese etwa 100 % betragende Differenz in der Aggrekan-mRNA-Synthese war wahrscheinlich auf den hydrostatischen Druck in den geschlossenen Kulturkammern zu zurückzuführen. In der Literatur wurde der positive Effekt des hydrostatischen Druckes auf Chondrozyten häufig beschrieben (Smith et al. 2000, Smith et al. 2004, Lee et al. 2005).

Die mRNA-Expression des auf die Dedifferenzierung der Knorpelzellen hinweisenden Kollagen Typ I stieg mit zunehmender Kultivationsdauer an, blieb jedoch stets unter dem Niveau der Kontrollkulturen. Die Differenz der niedrigen Expressionsraten in den ersten beiden Kulturwochen war gegenüber der Kontrolle statistisch signifikant ($p = 4,4 \cdot 10^{-6}$ 7 Tage, $p = 0,002$ 14 Tage). Nach 28 Tagen ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,09$).

Gleichsinnig präsentierte sich das Verhältnis von Kollagen Typ I zu Typ II. Die Relation stieg mit zunehmender Kultivation an, blieb aber stets unter dem Niveau der Kontrolle. Auch hier präsentierte sich die Differenz zur Kontrollkultur in den ersten beiden Wochen als statistisch signifikant. Nach 28 Tagen besteht lediglich ein Trend.

Die von Kaps und Mitarbeitern (2004) veröffentlichte Studie verfolgte die De- und Redifferenzierung von humanen Chondrozyten bei der Herstellung eines autologen Chondrozytentransplantats auf der Basis von Fibrin und Polyglactin/Polydioxanon. Im Unterschied zu dem hier genutzten Prinzip, zog es die o. g. Arbeitsgruppe vor, die Chondrozyten vor der Implantation in die 3-dimensionale Kultur in einer Monolayerkultur zu vermehren. Hierbei wurden die charakteristischen chondrozytären Gene (u. a. Kollagen Typ II, Aggrekan) reprimiert, während die Kollagene Typ I und Typ III induziert wurden. Die Aussaat der dedifferenzierten Chondrozyten in das 3D-Trägersystem wirkte sich nach etwa einer Woche positiv auf die Redifferenzierung chondrozytärer Gene aus: Die mRNA-Expression von Typ-II-Kollagen und Aggrekan stieg an, erreichte das Ausgangsniveau jedoch nicht. Die Aggrekan-mRNA-Expression sank nach zwei Wochen in der 3-dimensionalen Kultur sogar wieder leicht ab. Die beiden untersuchten Dedifferenzierungsmerkmale Kollagen Typ I und Typ II blieben auch in

der Trägermatrix auf dem Niveau des Housekeeping Gene GAPDH induziert. Die Gruppe schlussfolgerte, dass die 3D-Anordnung die chondrogene Differenzierung unterstütze.

Yates und Mitarbeiter (2005) verwendeten Kollagenschwämme als Träger für vorkultivierte bovine Chondrozyten. Dieses Konstrukt verweilte für sieben, 14 und 28 Tage in Kultur, und wurde anschließend u. a. molekularbiologisch mithilfe der vergleichenden, qualitativen RT-PCR analysiert: Während bei Kollagen Typ II in der ersten Kultivationswoche ein Rückgang der mRNA-Expression zu verzeichnen war, blieb dieser zwischen der zweiten und vierten Woche aus. Die mRNA-Expression von Aggrekan sank während der Kulturzeit beständig. Kollagen Typ I blieb in den ersten beiden Wochen auf konstant geringem Niveau, stieg in den darauf folgenden Wochen etwa um das Dreifache an.

Auch die Untersuchung der Genexpression der im Spongostan® kultivierten Knorpelzellen erlaubte den Schluss, dass dieser Träger die chondrogene Differenzierung stabilisiert. Jedoch ließ sich hier eine deutliche Zeitabhängigkeit erkennen: Die Expression der Differenzierungsmerkmale Typ-II-Kollagen und Aggrekan sank in der dritten und vierten Woche ab, während das Kollagen Typ I induziert wurde. Diese Ergebnisse korrelierten mit jenen der Immunhistologie und wiesen ebenso auf die ideale Kultivationsdauer des Chondrozytenimplantats von 14 Tagen hin.

Im Vergleich zu der Arbeit von Kaps et al. (2004) schien die fehlende Vorkultivierung der Chondrozyten einen Vorteil bei der Expression der Dedifferenzierungsmerkmale, nicht aber des Kollagen Typ II und Aggrekan zu haben. Dem steht jedoch die geringe Verfügbarkeit adulter, artikulärer Chondrozyten gegenüber.

Die Bestimmung des Glykosaminoglykgehaltes der de-novo synthetisierten Matrix erfolgte mit dem von Chandrasekhar und Mitarbeitern (1987) etablierten DMB-Assays photometrisch. Die GAG-Konzentration stieg in der zweiten Kulturwoche statistisch signifikant dreifach auf 0,21 µg/ml Kulturmasse an, und fiel in den letzten beiden Wochen wiederum statistisch signifikant zirka dreifach ($p=0,7 \cdot 10^{-5}$) ab.

In den zum Vergleich herangezogenen Veröffentlichungen stellten sich unterschiedliche Methoden der GAG-Bestimmung dar: Die rein qualitative mit der histologischen Safranin-O-Färbung, wie sie von Nehrer und Mitarbeitern (1998) oder aber Stark et al. (2006) bevorzugt wurde. So war es bei letztgenannten Arbeiten lediglich möglich, von einer Glykosaminoglykansynthese, nicht aber von der synthetisierten Menge zu sprechen.

Eine weitere Methode stellte die der ^{35}S -Sulfat-Inkorporation dar: Das Kulturmedium enthielt ^{35}S -Sulfat, welches von den Chondrozyten aufgenommen und anschließend zur Synthese der GAGs verwendet wurde. Anschließend wurde die Radioaktivität gemessen. Diese Methode, mit der eine Quantifizierung der GAG-Synthese möglich ist, fand über Jahrzehnte Anwendung (Wiebkin und Muir 1977, Yates et al. 2005, Stoddart et al. 2006).

In beiden Arbeiten, die die photometrische Methode, entweder mit DMB oder aber Alcian-Blau, zur Bestimmung des Glykosaminoglykangehaltes benutzten, korrelierten die ermittelten Konzentration mit der Kulturmasse (Frenkel et al. 1997) einerseits oder dem DNA-Gehalt andererseits (Goodstone et al. 2004). Trotz des ähnlichen Bezugspunktes - der Kulturmasse - war ein Vergleich unserer Ergebnisse mit denen Frenkels nicht möglich, da die genaue kultivierte Masse und deren Einfluss auf die Untersuchungsmethode unbekannt war.

Die Bestimmung des GAG-Gehaltes der in den Minusheets synthetisierten Matrix deutete, ebenso wie die immunhistologischen und die molekulargenetische Untersuchungen, einen idealen Kultivationszeitraum von 14 Tagen an.

8. Schlussfolgerungen

Ein erstes Ziel der vorliegenden Arbeit war die Beantwortung der Frage, ob die Kultivierung von bovinen Knorpelzellen in Anwesenheit des Hämostypikums Spongostan® vertretbar erscheint. Die Ergebnisse zeigten einerseits, dass die Proliferation von Chondrozyten ohne Vitalitätseinbußen durchführbar war. Andererseits offenbarte diese Arbeit, dass das Gelatine basierte Spongostan® die Dedifferenzierung der Chondrozyten in einer 2-dimensionalen Kultur verzögert.

Die Gesamtheit der Ergebnisse dieser Arbeit überblickend, ist die Aussage zulässig, dass es gelungen ist, auf der Basis des Hämostypikums Spongostan® ein membranverankertes Chondrozytenimplantat herzustellen. Die einfache Handhabung des Spongostan®-Pulvers, seine fehlende toxische Wirkung auf bovine Chondrozyten, sowie die feste Haftung an der Kollagenmembran seien besonders hervorgehoben. Die Zusammenschau der Ergebnisse aus immunhistologischen, molekulargenetischen und biochemischen Untersuchungen wies auf eine ideale Kulturdauer von 14 Tagen hin: Die GAG-Konzentration befand sich auf einem Maximum. Die Differenzierungsmerkmale Kollagen Typ II und Aggrekan waren ubiquitär und perizellulär immunhistologisch darstellbar. Auch deren mRNA-Expression lag über jener der zum Vergleich herangezogenen Monolayerkulturen. Der Dedifferenzierungsmarker Typ-I-Kollagen war molekularbiologisch und immunhistologisch zwar nachweisbar, aber in geringerem Maße als in der Kontrolle, sowie der vierwöchigen Kultur.

Warum jedoch verschlechterten sich die Ergebnisse in der dritten und vierten Kultivationswoche? Es könnte eine sich mit zunehmender Kultivationsdauer verschlechternde Ernährungssituation der Chondrozyten in der Kulturkammer verantwortlich sein. Ebenso kämen negative Einflüsse des degradierenden Trägermaterials infrage, etwa in Form von Kollagenfragmenten, die die de-novo synthetisierte Extrazellulärmatrix zerstören (Jennings et al. 2001).

Eine homogene Besiedlung des Spongostan® mit Chondrozyten und der anhaltende, sachgemäße Verschluss der Minusheets jedoch gelangen nur mit geübter Hand. Eine variable Anpassung des Implantates an einen osteochondralen Defekt ist derzeit nur bedingt möglich, da die Minusheets lediglich in runder Form kommerziell erhältlich sind.

Das Gesamtergebnis dieser Arbeit verdeutlicht, dass es ein weiter Weg ist, mithilfe des Tissue Engineering einen funktionierenden Knorpelersatz auf der Basis von Spongostan® herzustellen. Das in vitro erzeugte Chondrozyten-Spongostan®-Konstrukt unterscheidet sich erheblich vom nativen Knorpelgewebe. Es wird die Herausforderung sein, in den nächsten Jahren Knor-

pelzellen nicht nur ohne Dedifferenzierung vermehren zu können, sondern sie so zu beeinflussen, dass die synthetisierte Extrazellulärmatrix die arkadenförmige Struktur und damit die beeindruckenden Eigenschaften des gesunden Knorpels zu übernehmen im Stande ist.

9. Literaturverzeichnis

- Aigner T, Stoss H, Weseloh G, Zeiler G, von der Mark K. 1992. Activation of collagen type II expression in osteoarthritic and rheumatoid cartilage. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 62 (6):337-345.
- Aigner T, Bertling W, Stoss H, Weseloh G, von der Mark K. 1993. Independent expression of fibril-forming collagens I, II, and III in chondrocytes of human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest*, 91 (3):829-837.
- Allemann F, Mizuno S, Eid K, Yates KE, Zaleske D, Glowacki J. 2001. Effects of hyaluronan on engineered articular cartilage extracellular matrix gene expression in 3-dimensional collagen scaffolds. *J Biomed Mater Res*, 55 (1):13-19.
- Andereya S, Maus U, Gavenis K, Müller-Rath R, Miltner O, Mumme T, Schneider U. 2006. Erste klinische Erfahrungen mit einem neuartigen dreidimensionalen Kollagengel (CaRes) zur Behandlung fokaler Knorpeldefekte am Kniegelenk. *Z Orthop*, 144 (3):272-280.
- Bentley G, Biant LC, Carrington RW, Akmal M, Goldberg A, Williams AM, Skinner JA, Pringle J. 2003. A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee. *J Bone Joint Surg Br*, 85 (2):223-230.
- Benya PD, Shaffer JD. 1982. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*, 30 (1):215-224.
- Bobic V. 1996. Arthroscopic osteochondral autograft transplantation in anterior cruciate ligament reconstruction: a preliminary clinical study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 3 (4):262-264.
- Bonaventure J, Kadhon N, Cohen-Solal L, Ng KH, Bourguignon J, Lasselin C, Freisinger P. 1994. Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Exp Cell Res*, 212 (1):97-104.

- Brittberg M, Nilsson A, Ohlsson C, Peterson L. 1996. Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes. *Clin Orthop*, (326):270-283.
- Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. 1994. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*, 331 (14):889-895.
- Buckwalter JA. 2002. Articular cartilage injuries. *Clin Orthop Relat Res*, (402):21-37.
- Buckwalter JA, Mankin HJ. 1998. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr Course Lect*, 47:487-504.
- Buckwalter JA, Woo SL, Goldberg VM, Hadley EC, Booth F, Oegema TR, Eyre DR. 1993. Soft-tissue aging and musculoskeletal function. *J Bone Joint Surg Am*, 75 (10):1533-1548.
- Chandrasekhar S, Esterman MA, Hoffman HA. 1987. Microdetermination of proteoglycans and glycosaminoglycans in the presence of guanidine hydrochloride. *Anal Biochem*, 161 (1):103-108.
- Dekel S, Weissman SL. 1978. Joint changes after overuse and peak overloading of rabbit knees in vivo. *Acta Orthop Scand*, 49 (6):519-528.
- Dell'Accio F, De Bari C, Luyten FP. 2001. Molecular markers predictive of the capacity of expanded human articular chondrocytes to form stable cartilage in vivo. *Arthritis Rheum*, 44 (7):1608-1619.
- Dell'Accio F, Vanlauwe J, Bellemans J, Neys J, De Bari C, Luyten FP. 2003. Expanded phenotypically stable chondrocytes persist in the repair tissue and contribute to cartilage matrix formation and structural integration in a goat model of autologous chondrocyte implantation. *J Orthop Res*, 21 (1):123-131.
- Erggelet C, Steinwachs M. 1998. Die operative Behandlung von Gelenkknorpel-Defekten. *SFA Arthroskopie aktuell* (11): 4-15

- Fan Z, Bau B, Yang H, Soeder S, Aigner T. 2005. Freshly isolated osteoarthritic chondrocytes are catabolically more active than normal chondrocytes, but less responsive to catabolic stimulation with interleukin-1beta. *Arthritis Rheum*, 52 (1):136-143.
- Frenkel SR, Toolan B, Menche D, Pitman MI, Pachence JM. 1997. Chondrocyte transplantation using a collagen bilayer matrix for cartilage repair. *J Bone Joint Surg Br*, 79 (5):831-836.
- Fritz J. 2003. Technik der Autologen Chondrozytentransplantation (ACT). In: Fritz J, Aicher W, Eichhorn H, Hrsg. *Praxisleitfaden Knorpelreparatur*. 1te Aufl. Heidelberg: Springer Verlag, 85-95.
- Gaissmaier C, Fritz J, Benz K, Stoop R, Schewe B, Weise K. 2003. Biomaterialien für die Transplantation chondrogener Zellen zur biologischen Rekonstruktion artikulärer Knorpeldefekte. *SFA Arthroskopie aktuell* (16): 4-14.
- Gaissmaier C, Fritz J, Mollenhauer J, Schneider U, Marlovits S, Anders J, Schewe B, Weise K. 2003b. Verlauf klinisch symptomatischer Knorpelschäden des Kniegelenks. Ergebnisse ohne und mit biologischer Rekonstruktion. *Deutsches Ärzteblatt*, (100):2448-2453.
- Gelber AC, Hochberg MC, Mead LA, Wang NY, Wigley FM, Klag MJ. 2000. Joint injury in young adults and risk for subsequent knee and hip osteoarthritis. *Ann Intern Med*, 133 (5):321-328.
- Gille J, Ehlers EM, Okroi M, Russlies M, Behrens P. 2002. Apoptotic chondrocyte death in cell-matrix biocomposites used in autologous chondrocyte transplantation. *Ann Anat*, 184 (4):325-332.
- Goodstone NJ, Cartwright A, Ashton B. 2004. Effects of high molecular weight hyaluronan on chondrocytes cultured within a resorbable gelatin sponge. *Tissue Eng*, 10 (3-4):621-631

- Hangody L, Fules P. 2003. Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience. *J Bone Joint Surg Am*, 85-A Suppl 2:25-32.
- Häuselmann HJ, Oppliger L, Michel BA. 1994. Nitric oxide and proteoglycan synthesis by human articular chondrocytes. *FEBS Lett*, (352):361.
- Häuselmann HJ, Aydelotte MB, Schumacher BL, Kuettner KE, Gitelis SH, Thonar EJ. 1992. Synthesis and turnover of proteoglycans by human and bovine adult articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Matrix*, 12 (2):116-129.
- Häuselmann HJ, Masuda K, Hunziker E, Neidhart M, Mok S, Michel BA, Thonar EJ. 1996. Adult chondrocytes cultured in alginate form a matrix similar to native human cartilage. *Am J Physiol*, (271):742-752.
- Hering TM, Kollar J, Huynh TD, Varelas JB, Sandell LJ. 1994. Modulation of extracellular matrix gene expression in bovine high-density chondrocyte cultures by ascorbic acid and enzymatic resuspension. *Arch Biochem Biophys*, 314 (1):90-98.
- Homminga GN, Buma P, Koot HW, van der Kraan PM, van den Berg WB. 1993. Chondrocyte behavior in fibrin glue in vitro. *Acta Orthop Scand*, 64 (4):441-445.
- Horwitz AL, Dorfman A. 1970. The growth of cartilage cells in soft agar and liquid suspension. *J Cell Biol*, 45 (2):434-438.
- Hsu SH, Chang SH, Yen HJ, Whu SW, Tsai CL, Chen DC. 2006. Evaluation of biodegradable polyesters modified by type II collagen and Arg-Gly-Asp as tissue engineering scaffolding materials for cartilage regeneration. *Artif Organs*, 30 (1):42-55.
- Hunziker E. 2003. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis and Cartilage*, (10):432-463.

- Jennings L, Wu L, King K, Hammerle H, Cs-Szabo G, Mollenhauer J. 2001. The effects of collagen fragments on the extracellular matrix metabolism of bovine and human chondrocytes. *Connect tissue Research*, (42):71-86.
- Jerosch J, Hoffstetter I, Reer R. 1996. Current treatment modalities of osteochondritis dissecans of the knee joint: results of nation-wide German survey. *Acta Orthop Belg*, 62:83-89.
- Kaps C, Fuchs S, Endres M, Vetterlein S, Krenn V, Perka C, Sittinger M. 2004. Molekulare Charakterisierung von gezüchteten humanen dreidimensionalen Chondrozytentransplantaten. *Der Orthopäde*, 33:76-84.
- Knutsen G, Engebretsen L, Ludvigsen TC, Drogset JO, Grontvedt T, Solheim E, Strand T, Roberts S, Isaksen V, Johansen O. 2004. Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial. *J Bone Joint Surg Am*, 86-A (3):455-464.
- Kuettner KE. 1992. Biochemistry of articular cartilage in health and disease. *Clin Biochem*, 25 (3):155-163.
- Lee CY, Liu X, Hsu HC, Wang DY, Luo ZP. 2005. A modified cell culture method for autologous chondrocyte transplantation. *Connect Tissue Res*, 46 (2):93-99.
- Li WJ, Tuli R, Huang X, Laquerriere P, Tuan RS. 2005a. Multilineage differentiation of human mesenchymal stem cells in a three-dimensional nanofibrous scaffold. *Biomaterials*, 26 (25):5158-5166.
- Li WJ, Tuli R, Okafor C, Derfoul A, Danielson KG, Hall DJ, Tuan RS. 2005b. A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 26 (6):599-609.
- Light R, Prentice H. 1945. Surgical investigation of a new absorbable sponge derived from gelatin for use in hemostasis. *J Neurosurg*, 2:435-455.

- Loehnert J, Hrsg. 1997. Autologous chondrocyte transplantation for the regeneration of articular cartilage in the knee; Early clinical results. Transactions 2nd Fribourg Internation Symposium of cartilage repair.
- Löffler G. 2005. Basiswissen Biochemie. Aufl. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- Mandelbaum BR, Browne JE, Fu F, Micheli L, Mosely JB, Jr., Erggelet C, Minas T, Peterson L. 1998. Articular cartilage lesions of the knee. Am J Sports Med, 26 (6):853-861.
- Maroudas A, Mizrahi J, Katz EP, Wachtel EJ, Soudry M. 1986. Physico-chemical properties and functional behavior of normal and osteoarthrotic human cartilage. In: Kuettner K, Schleyerbach R, Hascall V, Hrsg. Articular cartilage biochemistry. Aufl. New York: Raveb Press, 311-329.
- Martinek V. 2003. Anatomie und Pathophysiologie des hyalinen Knorpels. Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin, 54 (6):166-170.
- Meinhart J, Fussenegger M, Hobling W. 1999. Stabilization of fibrin-chondrocyte constructs for cartilage reconstruction. Ann Plast Surg, 42 (6):673-678.
- Messner K. 1999. Knorpelersatzoperationen mit vorkultivierten Zellen. Der Orthopäde, 28:61-67.
- Messner K, Maletius W. 1996. The long-term prognosis for severe damage to weight-bearing cartilage in the knee: a 14-year clinical and radiographic follow-up in 28 young athletes. Acta Orthop Scand, 67 (2):165-168.
- Minuth WW, Strehl R, Schumacher K. 2003. Zukunftstechnologie Tissue Engineering. 1te Aufl. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Mohr W. 1998. Morphogenese der Osteoarthrose. Arthroskopie, (6):195-200.
- Mollenhauer J, Kuettner K. 1997. Articular Cartilage. In: Dee R, Hurst L, Gruber M, Kottmeier S, Hrsg. Principles of Orthopaedic Practice. Aufl. McGraw-Hill, 85-94.

Nehrer S, Breinan HA, Ramappa A, Hsu HP, Minas T, Shortkroff S, Sledge CB, Yannas IV, Spector M. 1998. Chondrocyte-seeded collagen matrices implanted in a chondral defect in a canine model. *Biomaterials*, 19 (24):2313-2328.

Niethard FU, Pfeil J. 1997. *Duale Reihe: Orthopädie*. Aufl. Stuttgart: Hippokrates-Verlag.

Oegema TRJ, Thompson RCJ. 1986. Metabolism of chondrocytes derived from normal and osteoarthrotic human cartilage. In: Kuettner K, Schleyerbach R, Hascall V, Hrsg. *Articular cartilage biochemistry*. Aufl. New York: Raven press, 257-272.

Paganelli C, Fontana P, Porta F, Majorana A, Pazzaglia UE, Sapelli PL. 2006. Indications on suitable scaffold as carrier of stem cells in the alveoloplasty of cleft palate. *J Oral Rehabil*, 33 (8):625-629.

Peretti GM, Randolph MA, Villa MT, Buragas MS, Yaremchuk MJ. 2000. Cell-based tissue-engineered allogeneic implant for cartilage repair. *Tissue Eng*, 6 (5):567-576.

Perka C. 1999. *Die Rekonstruktion von Knorpel- und Knochendefekten - Untersuchungen zu den strategischen Möglichkeiten des Tissue Engineering in der Orthopädie*. [Habilitation]. Berlin: Medizinische Fakultät Charité der Humboldt-Universität.

Perka C, Spitzer RS, Lindenhayn K, Sittinger M, Schultz O. 2000. Matrix-mixed culture: new methodology for chondrocyte culture and preparation of cartilage transplants. *J Biomed Mater Res*, 49 (3):305-311.

Peterson L, Ellis E, Hupp J, Tucker. 1988. *Contemporary oral and maxillofacial surgery*. 1te Aufl. St. Louis: The C.V. Mosby Co.

Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjogran-Jansson E, Lindahl A. 2000. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop*, (374):212-234.

- Poole CA. 1993. The structure and function of articular cartilage matrices. In: Woessner JF, Howell DS, Hrsg. Joint cartilage degeneration. Aufl. New York: Marcel Dekker, Inc., 1-35.
- Prakash D, Learmonth D. 2002. Natural progression of osteo-chondral defect in the femoral condyle. *Knee*, 9 (1):7-10.
- Pridie K. 1959. A method of resurfacing osteoarthrotic knee joints. *J Bone Joint Surg Br*, 41:618-619.
- Rosenberg LC, Buckwalter JA. 1986. Cartilage proteoglycans. In: Kuettner K, Schleyerbach R, Hascall V, Hrsg. Articular cartilage biochemistry. Aufl. New York: Raven Press, 39-57.
- Rössler H, Rütther W. 2005. Orthopädie und Unfallchirurgie. Aufl. München: Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag.
- Rüter A, Trentz O, Wagner M. 2004. Unfallchirurgie. 2te Aufl. München: Urban & Fischer, Elsevier GmbH.
- Schmidt H, Hasse E. 1989. Arthroscopic surgical treatment of circumscribed cartilage damage with spongiolization or Pridie drilling. *Beitr Orthop Traumatol*, 36:35-37.
- Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K. 2004. Prometheus. Lernatlas der Anatomie. Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ. 1993. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*, 75 (4):532-553.
- Sittinger M, Reitzel D, Dauner M, Hierlemann H, Hammer C, Kastenbauer E, Planck H, Burmester GR, Bujia J. 1996. Resorbable polyesters in cartilage engineering: affinity and biocompatibility of polymer fiber structures to chondrocytes. *J Biomed Mater Res*, 33 (2):57-63.

- Sledge S. 2001. Microfracture techniques in the treatment of osteochondral injuries. Clin Sports Med, 20:365-377.
- Smith RL, Carter DR, Schurman DJ. 2004. Pressure and shear differentially alter human articular chondrocyte metabolism: a review. Clin Orthop Relat Res, (427 Suppl):S89-95.
- Smith RL, Lin J, Trindade MC, Shida J, Kajiya G, Vu T, Hoffman AR, van der Meulen MC, Goodman SB, Schurman DJ, Carter DR. 2000. Time-dependent effects of intermittent hydrostatic pressure on articular chondrocyte type II collagen and aggrecan mRNA expression. J Rehabil Res Dev, 37 (2):153-161.
- Sokoloff L. 1982. Repair mechanisms of articular cartilage. J Am Podiatry Assoc, 72 (5):228-232.
- Stark Y, Suck K, Kasper C, Wieland M, van Griensven M, Scheper T. 2006. Application of collagen matrices for cartilage tissue engineering. Exp Toxicol Pathol, 57 (4):305-311.
- Steadman J, Rodkey W, Briggs K, Rodrigo J. 1999. The microfracture technic in the management of complete cartilage defects in the knee joint. Orthopäde, 28:26-32.
- Stoddart MJ, Ettinger L, Hauselmann HJ. 2006. Generation of a scaffold free cartilage-like implant from a small amount of starting material. J Cell Mol Med, 10 (2):480-492.
- Strobel M, Stedtfeld H-W, Eichhorn H. 1995. Diagnostik des Kniegelenks. 3te Aufl. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag.
- Terada S, Yoshimoto H, Fuchs JR, Sato M, Pomerantseva I, Selig MK, Hannouche D, Vacanti JP. 2005. Hydrogel optimization for cultured elastic chondrocytes seeded onto a polyglycolic acid scaffold. J Biomed Mater Res A, 75 (4):907-916.
- Wagner H. 1972. Möglichkeiten und klinische Erfahrungen mit der Knorpeltransplantation. Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete, (110):708-715.

- Weise K. 2004. Knorpelersatz. In: Rüter A, Trentz O, Wagner M, Hrsg. Unfallchirurgie. Aufl. München: Urban & Fischer Verlag, Elsevier GmbH, 183-190.
- Wiebkin OW, Muir H. 1977. Synthesis of proteoglycans by suspension and monolayer cultures of adult chondrocytes and de novo cartilage nodules-the effect of hyaluronic acid. J Cell Sci, 27:199-211.
- Wirth C, Rudert M. 1996. Techniques of cartilage growth enhancement: a review of the literatur. Arthroscopy, (12):300-308.
- Yates KE, Allemann F, Glowacki J. 2005. Phenotypic analysis of bovine chondrocytes cultured in 3D collagen sponges: effect of serum substitutes. Cell Tissue Bank, 6 (1):45-54.

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Zonale Gliederung des hyalinen Knorpels (nach Schünke et al. 2004)	3
Abb. 2:	Schematische Darstellung des großen Aggrekanmolekküls. Aus http://www.cmb.lu.se/ctb/html/Aggrecan.htm	6
Abb. 3:	Kollagenfasern und Proteoglykane als Strukturelemente beim Aufbau der Extrazellulären Matrix (nach Löffler 2005)	6
Abb. 4:	Osteochondrosis dissecans im Stadium III am medialen Femurkondylus. Aus (Strobel et al. 1995)	8
Abb. 5:	Die seitliche Aufnahme bestätigt das Knorpel-Knochen-Stück, welches das Mausbett noch nicht verlassen hat. Aus (Strobel et al. 1995)	8
Abb. 6:	Arthroskopische Sicherung eines großen Corpus liberum bei alter OD. Aus (Strobel et al. 1995)	8
Abb. 7:	„Contained“ und „uncontained lesion“. Aus (Erggelet und Steinwachs 1998)	8
Abb. 8:	Refixation zweier Knorpelfragmente an der lateralen Femurkondyle. Aus (Weise 2004)	10
Abb. 9:	Schematische Darstellung der Mikrofrakturierung. Aus (Weise 2004)	10
Abb. 10:	Mosaikplastik: Entnahme der Knorpel-Knochen-Zylinder (links), Ergebnis der Operation (rechts). Aus (Rüter et al. 2004)	10
Abb. 11:	Schematische Darstellung der Vorgehensweise bei einer ACT. Modifiziert nach (Mandelbaum et al. 1998)	11
Abb. 12:	Bioaktive Kammer	11
Abb. 13:	Künstliche Gewebeherstellung im Sinne des Tissue Engineering. Aus (Minuth et al. 2003)	13
Abb. 14:	Struktur der NOVOCART®-Membran der Firma TETEC. Aus Werbebroschüre der Firma TETEC.	14
Abb. 15:	Histologische Aufnahme von Spongostan® im polarisierten Licht. 40-fache Vergrößerung	17
Abb. 16:	Modell der ersten Kulturkammer.	17

Abb. 17:	Schematisch dargestelltes Prinzip der Minusheets®. Aus (Minuth et al. 2003)	18
Abb. 18:	Anatomie des bovinen Kniegelenkes. Aus (Budras und Wünsche 2002)	24
Abb. 19:	Femur mit flektierter Tibia.	25
Abb. 20:	Präpariertes Knorpelschüppchen	25
Abb. 21:	Schema der Fuchs – Rosenthal - Zählkammer im Phasenkontrast.	26
Abb. 22:	Vergrößerte Aufnahme, Beispiele für die lichtmikroskopische Morphologie eines toten und eines vitalen Chondrozyten	26
Abb. 23:	Herstellung der Chondrozyten-Spongostan®-Masse (a-c)	27
Abb. 24:	Die als Kulturkammer dienenden Minusheets® (a-c)	28
Abb. 25:	Schmelzkurven der qRT-PCR-Standards	35
Abb. 26:	Schmelzkurve unreinen qRT-PCR-Proben	35
Abb. 27:	Darstellung einer Aggrekan – Standardkurve	36
Abb. 28:	Monolayerkulturen: Kollagen-Typ-II-mRNA-Expression	38
Abb. 29:	Monolayerkulturen: Kollagen-Typ-I-mRNA-Expression	39
Abb. 30:	Monolayerkulturen: Verhältnis der mRNA-Expressionen von Kollagen-Typ-I zu Typ II.	39
Abb. 31:	Makroskopisches Ergebnis eines siebentägigen Experimentes	40
Abb. 32:	Runde Chondrozytenkerne nach 7-tägiger Kultivierung. 40-fache Vergrößerung	41
Abb. 33:	Langgestreckte Knorpelzellkerne nach 28-tägiger Kultur. 40-fache Vergrößerung	41
Abb. 34:	Kollagen-Typ-II-Färbung als Übersichtsaufnahme einer 7-tägigen Kultur. 10-fache Vergrößerung	41
Abb. 35:	Kollagen-Typ-II-Färbung in einer 7-Tages-Kultur. 40-fache Vergrößerung	41
Abb. 36:	Kollagen-Typ-II-Färbung: Ausschnitt aus einer 7-Tages-Kultur. 40-fache Vergrößerung	42
Abb. 37:	Abb. 36 ohne Belichtung des DAPI-gefärbten Zellkerns. 40-fache Vergrößerung.	42
Abb. 38:	Aggrekan-Färbung einer 7-Tages-Kultur. 20-fache Vergrößerung	42
Abb. 39:	Aggrekan-Färbung einer 7-Tages-Kultur. 40-fache Vergrößerung	42

Abb. 40:	Pro-Kollagen-Typ-I-Färbung einer 7-Tages-Kultur. 20-fache Vergrößerung.	42
Abb. 41:	Pro-Kollagen-Typ-I-Färbung einer 7-Tages-Kultur. 40-fache Vergrößerung.	42
Abb. 42:	Kollagen-Typ-II-mRNA-Expression in einer 7-Tages-Kultur.	43
Abb. 43:	Aggrekan-mRNA-Expression in einer 7-Tages-Kultur.	43
Abb. 44:	Kollagen-Typ-I-mRNA-Expression in einer 7-Tages-Kultur.	44
Abb. 45:	Verhältnis der mRNA-Expression von Kollagen Typ I zu Typ II.	44
Abb. 46:	Kollagen-Typ-II-Färbung einer 14-Tages-Kultur. 10-fache Vergrößerung.	44
Abb. 47:	Kollagen-Typ-II-Färbung einer 14-Tages-Kultur. 40-fache Vergrößerung.	44
Abb. 48:	Aggrekanexpression in einer 14-Tageskultur. 20-fache Vergrößerung.	45
Abb. 49:	Aggrekanexpression. 40-fache Vergrößerung.	45
Abb. 50:	Aggrekanexpression. 40-fache Vergrößerung.	45
Abb. 51:	Pro-Kollagen-Typ-I-Färbung in einer 14-Tages-Kultur. 20-fache Vergrößerung.	45
Abb. 52:	Pro-Kollagen-Typ-I-Färbung in einer 14-Tages-Kultur. 40-fache Vergrößerung.	45
Abb. 53:	Kollagen-Typ-II-mRNA-Expression in einer 14-Tages-Kultur.	46
Abb. 54:	Aggrekan-mRNA-Expression in einer 14-Tages-Kultur.	46
Abb. 55:	Kollagen-Typ-I-mRNA-Expression in einer 14-Tages-Kultur.	47
Abb. 56:	Verhältnis der mRNA-Expression von Kollagen Typ I zu Typ II.	47
Abb. 57:	Differente Aggrekan-mRNA-Expression in geschlossenem vs. offenem Kultursystem.	47
Abb. 58:	Kollagen-Typ-II-Färbung in einer 28-Tages-Kultur. 10-fache Vergrößerung.	48
Abb. 59:	Kollagen-Typ-II-Färbung einer 28-Tages-Kultur. 40-fache Vergrößerung.	48
Abb. 60:	Aggrekan-Färbung einer 28-Tages-Kultur. 20-fache Vergrößerung.	48
Abb. 61:	Aggrekan-Färbung einer 28-Tages-Kultur. Doppelbelichtung, 40-fache Vergrößerung.	49

Abb. 62:	Einfachbelichtung von Abb. 61, zur Darstellung der Aggrekanexpression. 40-fache Vergrößerung.	49
Abb. 63:	Pro-Kollagen-Typ-I-Färbung einer 28-Tages-Kultur. 20-fache Vergrößerung.	49
Abb. 64:	Pro-Kollagen-Typ-I-Färbung einer 28-Tages-Kultur. 40-fache Vergrößerung.	49
Abb. 65:	Kollagen-Typ-II-mRNA-Expression in einer 28-Tages-Kultur.	50
Abb. 66:	Aggrekan-mRNA-Expression in einer 28-Tages-Kultur.	50
Abb. 67:	Kollagen-Typ-I-mRNA-Expression in einer 28-Tages-Kultur.	50
Abb. 68:	Verhältnis der mRNA-Expression von Kollagen Typ I zu Typ II.	50
Abb. 69:	Glykosaminoglykankonzentration pro mg kultivierter Masse in den Minusheets	51

Ergänzungen zu den verwendeten Primern (S. 36)

Gen	Spezies	Größtes PCR- Produkt	Tempe- ratur	Sequenz
GAPDH - upstream	Human/ bovin/ Schaf	hu 254/ sheep 234	60°C	CATCACTGCCACCCAGAAGA
GAPDH - downstream	Human/ bovin/ Schaf		60°C	CCTGCTTCACCACCTTCTTG
Kollagen Typ II (COL2A1) upstream	Human/ bovin	hu/bo: 604/600	60°C	CATCTGGTTTGGAGAAAC- CATC
Kollagen Typ II downstream	Human/ bovin		60°C	GCCCAGTTCAGGTCTCTTAG
Kollagen Typ I (COL 1A2) upstream	Bovin	504	60°C	CTCAGACCCAAGGATTAT- GAAG
Kollagen Typ I downstream	Bovin		60°C	GGATCCTTGCAGAATGACAG
Aggrekan 1 upstream	Human/ bovin	111	55°C	ACTTCCGCTGGTCAGATGGA
Aggrekan 1 downstream	Human/ bovin		55°C	TCTCGTGCCAGATCATCACC

Die Primer für GAPDH und Kollagen Typ II wurden in der Forschungsabteilung des Waldkrankenhauses “Rudolf Elle” hergestellt.

Der Primer für Kollagen Typ I wurde von Dr. I. Stonans entworfen und hergestellt.

Der Primer für Aggrekan wurde basierend auf einer Publikation von Fan und Mitarbeitern (Fan et al. 2005) in der Forschungsabteilung des Waldkrankenhauses „Rudolf Elle“ synthetisiert.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Dr. med. J. Anders,

J. Schömburg,

C. Müller,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Weimar, am 17. November 2006

Anja Beberhold, Verfasserin

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. R. A. Venbrocks, Direktor des Waldkrankenhauses Rudolf Elle, Klinik für Orthopädie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, danke ich für die Überlassung des Themas als Dissertation und sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herrn Dr. med. J. Anders sage ich Dank für die kompetente Betreuung, seine Unterstützung und die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Weiterer Dank gilt dem Team der Forschungsabteilung des Rudolf-Elle-Krankenhauses Eisenberg. Insbesondere danke ich Frau Jana Schömburg für ihre geduldige Unterstützung während der Entwicklung der Methodik, Frau M.A. Jana Neuwirth und Frau Dipl. Biochem. Anke Rüttger für die Vorschläge und Kritik bei der Erstellung der Dissertation. Frau Cordula Müller danke ich für die helfende, sachkundige Hand in allen histologischen Belangen. Herrn Hardy Hauk sage ich Dank für die Erstellung und Bearbeitung der Fotografien.

Meinem Mann und meinen Eltern danke ich herzlich für ihr Verständnis und die uneingeschränkte Unterstützung während meines Studiums.

Lebenslauf

Anja Beberhold, geb. Großmann

23. Januar 1982	geboren in Dresden
9/1988 - 8/1990	Polytechnische Oberschule „ <i>Max Seydewitz</i> “ Dürrröhrsdorf - Dittersbach
9/1990 – 8/1992	Grundschule Dürrröhrsdorf - Dittersbach
8/1992 - 7/2000	Gymnasium „ <i>Johann - Gottfried - Herder</i> “ in Pirna - Copitz
7/2000	Allgemeine Hochschulreife (Abitur)
10/2000 - 12/2007	Studium der Humanmedizin an der „ <i>Friedrich Schiller - Universität</i> “ Jena
9/2002	Ärztliche Vorprüfung
9/2003	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
9/2005	Zweiter Teil der Ärztlichen Prüfung
10/2005 - 3/2006	Anfertigung der Dissertation am Lehrstuhl für Orthopädie am Walkrankenhaus „ <i>Rudolf Elle</i> “, Eisenberg
4/2006 - 8/2006	Praktisches Jahr am Katholischen Kranken- haus, Klinik für Innere Medizin, Erfurt
12/2006 - 3/2007	Praktisches Jahr am <i>SHK- Weimar</i> , Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie
4/2007 - 7/2007	Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Dresden, Klinik und Poliklinik für Orthopädie
10/2007	Dritter Teil der Ärztlichen Prüfung
11/2007	Erfolgreiche Verteidigung der Dissertation

Anja Beberhold